



Universidad de Sevilla

TESIS DOCTORAL

**FACTORES NEUROTROFICOS Y ANTIOXIDANTES EN LÍQUIDO
CEFALORRAQUÍDEO DURANTE EL ENVEJECIMIENTO NORMAL O
CON DETERIORO COGNITIVO LEVE Y EN LA ENFERMEDAD DE
PARKINSON**

presentada por

Ángel Ignacio Martín de Pablos

para optar al título de

Doctor por la Universidad de Sevilla

Sevilla, 20 de diciembre 2018



**FACTORES NEUOTRÓFICOS Y ANTIOXIDANTES EN EL LÍQUIDO
CEFALORRAQUÍDEO DURANTE EL ENVEJECIMIENTO NORMAL O
CON DETERIORO COGNITIVO LEVE Y EN LA ENFERMEDAD DE
PARKINSON**

AUTOR

D. Ángel Ignacio Martín de Pablos

DIRECTOR Y TUTOR

Prof. Dr. Antonio Córdoba Fernández

DIRECTOR

Prof. Dr. Emilio Fernández Espejo

Sevilla, 20 de diciembre 2018



D. Emilio Fernández Espejo, Catedrático de Universidad, adscrito al Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla y **D. Antonio Córdoba Fernández**, Profesor Titular de Universidad, adscrito al Departamento de Podología de la Facultad de Enfermería, Fisioterapia y Podología de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN:

Que D. Ángel Ignacio Martín de Pablos, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado ***Factores Neurotróficos y Antioxidantes en Líquido Cefalorraquídeo durante el Envejecimiento Normal o con Deterioro Cognitivo Leve y en la Enfermedad de Parkinson*** y que reúne todas las condiciones necesarias para ser valorado por la Comisión Académica correspondiente y presentado a Tesis Doctoral.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, se firma en Sevilla a 20 de diciembre de 2018.

Antonio Córdoba Fernández

Director y Tutor de la Tesis doctoral

Prof. Dr. Emilio Fernández Espejo

Directo de la Tesis Doctoral



D. Ángel Ignacio Martín de Pablos, Licenciado en Medicina y Cirugía

HACE CONSTAR:

Que ha realizado la Tesis doctoral denominada ***Factores Neurotróficos y Antioxidantes en Líquido Cefalorraquídeo durante el Envejecimiento Normal o con Deterioro Cognitivo Leve y en la Enfermedad de Parkinson*** matriculado en el Programa de Doctorado de “Ciencias de la Salud”, en la Línea de Investigación “Procedimientos Clínicos, Intervenciones y Resultados en Salud” bajo la dirección de los doctores D. Emilio Fernández Espejo y D. Antonio Córdoba Fernández.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, se firma en Sevilla, 20 de diciembre de 2018.

D. Ángel Ignacio Martín de Pablos

Autor de la Tesis Doctoral

Agradecimientos

Ángel Ignacio Martín de Pablos, autor del proyecto, agradece al Hospital Universitario Virgen Macarena su colaboración en la consecución del mismo, permitiendo el uso de las instalaciones y documentación, así como a todos los pacientes participantes en el estudio.

El autor, quiere hacer especial mención a los directores de la tesis D. Emilio Fernández Espejo y D Antonio Córdoba Fernández por su continuo apoyo y dedicación durante la realización del trabajo doctoral.

Asimismo, el autor quiere mostrar su agradecimiento a D. Miguel Ángel Rico Corral, como presidente de la Comisión de Ética e Investigación Sanitaria del Área Hospitalaria Virgen Macarena y al Prof. Dr. Fernando Rodríguez Fernández como presidente del Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Sevilla

También es de destacar, la ayuda técnica recibida por parte de Dña. Silvia Castellano Casas y Dña. Mara Guerra Fernández del equipo BIO127 en el procesamiento de las muestras de líquido cefalorraquídeo y la ayuda para el estudio de Tibbling-Link de las muestras por parte Dña. María Isabel García Sánchez del Biobanco Hospitalario Virgen Macarena [Red Nacional de BioBancos, Instituto de Salud Carlos III RD 09/0076/00080], y la labor de la doctora Dña. Cintia Calvo del Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Virgen Macarena por los estudios SPECT de los pacientes.

Del mismo modo extender mi agradecimiento a la doctora María Dolores Franco, medico especialista en Psiquiatría con función asistencial en el Hospital Universitario Virgen Macarena por su aportación en el diagnóstico especializado de Deterioro Cognitivo Leve y al Servicio de Neurología por su aportación en el diagnóstico de Enfermedad de Parkinson Idiopática.

*A mis familiares y amigos,
por su motivación y apoyo
durante la realización
de esta tesis.*

*A mis padres,
por su ejemplo diario.*

A mis hijos Miguel Ángel y Rocío.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	23
CAPITULO I – INTRODUCCIÓN.....	25
1.1 EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO.....	27
1.2 FACTORES NEUOTRÓFICOS.....	47
1.3 FACTORES ANTIOXIDANTES.....	52
1.4 ENVEJECIMIENTO NORMAL.....	57
1.5 DETERIORO COGNITIVO LEVE.....	66
1.6 ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	71
CAPITULO II – HIPÓTESIS.....	89
CAPITULO III – OBJETIVOS.....	91
CAPITULO IV – MATERIAL Y MÉTODO.....	93
4.1 SUJETOS PARTICIPANTES.....	93
4.2 RECOGIDA DE MUESTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO.....	103
4.3 PROCESAMIENTO GENERAL DE LAS MUESTRAS.....	103
4.4 MÉTODO ESTADÍSTICO.....	107
4.5 ÉTICA.....	111
CAPITULO V – RESULTADOS.....	113
5.1 RESULTADOS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO NORMAL O CON DCL.....	113
5.1.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS SUJETOS.....	113
5.1.2 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN LCR.....	115
5.1.3 NIVELES DE FACTORES NEUOTRÓFICOS EN LCR.....	116
5.1.4 ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN LCR.....	118
5.1.5 CONTENIDO DE FERRITINA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE LCR....	121

5.2 RESULTADOS EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	125
5.2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y NEUROLÓGICAS DE LOS SUJETOS	125
5.2.2 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN LCR.....	126
5.2.3 NIVELES DE FACTORES NEUOTRÓFICOS EN LCR.....	127
5.2.4 ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN LCR.....	129
5.2.5 CONTENIDO DE FERRITINA EN LCR.....	133
5.2.6 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL DEL LCR.....	134
5.2.7 CUANTIFICACIÓN DEL ÍNDICE DE TIBBLING-LINK.....	135
CAPITULO VI DISCUSIÓN.....	137
CAPÍTULO VII- CONCLUSIONES.....	145
BIBLIOGRAFÍA.....	147
ANEXOS CERTIFICADOS.....	179
PUBLICACIONES DERIVADAS DEL TRABAJO DOCTORAL	187

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Circulación del líquido cefalorraquídeo.....	26
Figura 2 Estructura de los plexos coroideos.....	28
Figura 3 Flujos de formación y absorción del LCR dependiendo de la presión.....	30
Figura 4 Punción Lumbar: elementos involucrados.....	33
Figura 5 Punción lumbar y recogida de LCR.....	34
Figura 6 Electroforesis normal del LCR.....	37
Figura 7 Comparación del patrón electroforético de las proteínas séricas y del LCR....	39
Figura 8 Homeostasis redox y estrés oxidativo.....	52
Figura 9 Vías más destacadas de estrés oxidativo.....	55
Figura 10 Estructura de la ferritina.....	61
Figura 11 Microglía y envejecimiento.....	63
Figura 12 Cuerpo de Lewy.....	72
Figura 13 Etapas de desarrollo de cuerpos de Lewy.....	76
Figura 14 Cuerpos de Marinesco.....	79
Figura 15 Vías de estrés oxidativo en la enfermedad de Parkinson.....	82
Figura 16 Valores individuales de BDNF en LCR procedente de los sujetos con Envejecimiento Normal Avanzado o con Deterioro Cognitivo Leve.....	117
Figura 17 Actividad glutatión-S-transferasa GST ($\mu\text{mol}/\text{min}$) en LCR de sujetos con Envejecimiento Normal agrupados edad o con DCL.....	120
Figura 18 Valores individuales de PAO en LCR procedente de los sujetos de Envejecimiento Normal Avanzado o con Deterioro Cognitivo Leve.....	123
Figura 19 Correlación entre los niveles de $\text{TGF}\beta_1$ en LCR (pg/ml) y el UPDRS III.....	128

Figura 20 Actividad en LCR de las enzimas del sistema glutatión: GR-GPX-GST en sujetos con EP Temprana o Avanzada.....	129
Figura 21 Actividad enzimática en LCR de Catalasa en sujetos con EP Temprana o Avanzada.....	130
Figura 22 Actividad enzimática en LCR de Peroxirridoxinas en sujetos con EP Temprana o Avanzada.....	131
Figura 23 Actividad enzimática de Superóxidodismutasas en LCR de sujetos con EP Temprana o Avanzada	132
Figura 24 Contenido de Ferritina en el LCR en sujetos con EP Temprana o Avanzada	133
Figura 25 Capacidad antioxidante total (PAO) del LCR, en sujetos con EP Temprana o Avanzada.....	135

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición normal del LCR.....	36
Tabla 2 Valores de referencia de electroforesis proteica en LCR.....	39
Tabla 3 Edad, datos clínicos y numero de muestra de LCR de los sujetos de Envejecimiento Normal o con Deterioro Cognitivo Leve.....	98-99
Tabla 4 Edad, datos clínicos y numero de muestra de LCR de los sujetos con EP	100-101
Tabla 5 Numero de muestras empleadas en los distintos experimentos en los sujetos de Envejecimiento Normal o con Deterioro Cognitivo Leve.....	109
Tabla 6 Numero de muestras empleadas en los distintos experimentos en los sujetos con Enfermedad de Parkinson y grupo control.....	110
Tabla 7 Características clínicas de los sujetos de Envejecimiento.....	113
Tabla 8 Características clínicas de los sujetos con Deterioro Cognitivo Leve.....	114
Tabla 9 Composición general del LCR procedente de los sujetos de Envejecimiento...	115
Tabla 10 Niveles de factores neurotróficos en LCR procedente de los sujetos de Envejecimiento Normal agrupados por edad o con DCL.....	116
Tabla 11 Actividad de las enzimas antioxidantes GPX, GR, Catalasas, SODs y PRDXs en LCR procedente de los sujetos de Envejecimiento Normal agrupados por edad o con DCL.....	118
Tabla 12 Actividad enzimática de GST en LCR procedente de los sujetos de Envejecimiento Normal agrupados por edad o con DCL.....	120
Tabla 13 Contenido en Ferritina y potencial antioxidante del LCR procedente de los sujetos de Envejecimiento Normal agrupados por edad o con DCL.....	122
Tabla 14 Características clínicas de los sujetos con enfermedad de Parkinson y sujetos sin deterioro neurológico o sujetos control.....	125
Tabla 15 Datos neurológicos de los sujetos con Enfermedad de Parkinson.....	126

Tabla 16 Composición general del LCR en los sujetos con E. de Parkinson.....	126
Tabla 17 Niveles medios de factores neurotróficos GDNF, Persefina, Neurturina, $TGF\beta_1$ y $TGF\beta_2$ en el LCR de los sujetos con EP Temprana o Avanzada y de los sujetos control sin daño neurológico.....	127

RELACIÓN DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

- ABC, avidina biotina peroxidasa
- ADL, *activities of daily living*
- ANOVA, análisis de la varianza
- ARTN, artemina
- AOPP, *advanced oxidized protein products*
- α SYN, alfa-sinucleína
- BCA, ácido binicotínico
- BDNF, *brain derived neurotrophic factor*
- BHC, *barrera hematocefalorraquídea*
- BHE, *barrera hematoencefálica*
- BSA, suero bovino de albumina
- BSB, block & simple buffer
- CL, cuerpos de Lewy
- CM, cuerpos de Marinesco
- DA, dopamina
- DAT, transportador de dopamina
- EA, enfermedad de Alzheimer
- ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay,
- EP, enfermedad de Parkinson
- ERO, especies reactivas de oxígeno
- ERN, especies reactivas de nitrógeno
- FGF, fibroblast growth factor
- GDNF, glial-derived neurotrophic factor
- GFAP, proteína gliofibrilar ácida
- GFL, ligando de factores gliales
- GH, hormona del crecimiento
- GPX, glutatión peroxidasa
- GR, glutatión reductasa
- GSH, glutatión reducido

- GSSG, glutatión disulfuro u oxidado
- GST, glutatión-S-transferasa
- H₂O₂, peróxido de hidrógeno
- HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
- HO1, hemooxigenasa 1
- HOCl, ácido hipocloroso
- HRP, peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase)
- H-Y, Hoehn-Yahr
- HSA, albúmina sérica
- IgG, inmunoglobulina G
- IGF1, insulin like growth factor 1
- IL interleucina
- LC, *locus coeruleus*
- LCR, líquido cefalorraquídeo
- LDH, lactato dehidrogenasa
- mAB, anticuerpo monoclonal
- MAO, monoamino oxidasa
- MPO, mieloperoxidasa
- NA, noradrenalina
- NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- NGF, factor de crecimiento nervioso (nerve growth factor)
- NM, neuromelanina
- NO, óxido nítrico
- NOX, oxidasa de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- NRTN, neurturina
- OMS, Organización Mundial de la Salud
- pAB, anticuerpo policlonal específico
- PBS, tampón fosfato salino
- PL, punción lumbar
- PRDx, peroxiredoxina
- PSPN, persefina

- SBS, solución block & sample
- SH, grupo tiol
- SN, sustancia negra
- SNC, sistema nerviosos central
- SNpc, sustancia negra pars compacta
- SNpr, sustancia negra pars reticulata
- SOD, superóxido dismutasa
- SOH, ácido sulfénico
- SPECT, *Single Photon Emission Computed Tomography*
- TBST solución trisbuffered salina
- TGF, factor transformante de crecimiento (transforming growth factor)
- $TGF\beta_1$, *transforming growth factor- β_1*
- $TGF\beta_2$, *transforming growth factor- β_2*
- TH, tirosina hidroxilasa
- TMB, tetrametilbenzidina
- TNF, factor nervioso transformante
- TRF, transferrina
- UPDRS, *Unified Parkinson's disease rating scale*
- UPP, *ubiquitina-proteasoma*
- WST, *workin solution*

RESUMEN

El líquido cefalorraquídeo (LCR) se encuentra en íntimo contacto con el tejido nervioso, y en su composición puede reflejar lo que acontece en el mismo. Constituye una fuente ideal de biomarcadores, pudiéndose considerar las alteración de diferentes moléculas en el LCR reflejo de las alteraciones bioquímicas y neuropatológicas que se pueden desarrollar en el cerebro.

En el cerebro existe una producción muy abundante de factores tróficos. Los niveles de estos factores tróficos pueden evolucionar con el envejecimiento y/o la enfermedad y pueden tener su expresión en el LCR. Se cree que el envejecimiento se asocia a una microglía reactiva aumentada que segrega factores tróficos neuroinflamatorios en exceso que a su vez causa cambios reactivos en factores neurotróficos protectores de la neurona, situación que podría reflejarse en el LCR.

La muerte neuronal y la inflamación están estrechamente relacionadas al estrés oxidativo, y está ampliamente aceptado que el envejecimiento cerebral podría estar acelerado por la acción dañina de las especies reactivas de oxígeno, con expresión clínica de Deterioro Cognitivo.

La expresión en el LCR de proteínas relacionadas con los mecanismos de estrés oxidativo como son la actividad de enzimas antioxidantes o la concentración de factores neurotróficos relacionados con la inflamación no está del todo aclarada.

El presente trabajo doctoral ha abordado el estudio de diversas moléculas presentes en el LCR que podrían presentar cambios en el envejecimiento, bien durante el Envejecimiento Normal o en dos procesos muy relacionados con el envejecimiento, como son el Deterioro Cognitivo Leve (DCL) y la Enfermedad de Parkinson (EP).

Para ello, se ha extraído LCR a sujetos con Envejecimiento Normal, y a sujetos con diagnóstico de Deterioro Cognitivo Leve o de Enfermedad de Parkinson y se han cuantificado distintos factores moleculares en el mismo, utilizando principalmente test ELISA: niveles de factores neurotróficos dopaminérgicos (BDNF, GDNF, persefina y neurturina), niveles de factores neurotróficos proinflamatorios (TGF β ₁ y TGF β ₂), actividad de enzimas antioxidantes (glutación-peroxidasa, glutación-reductasa, catalasa,

glutación-S-transferasa, peroxirredoxinas y superóxido-dismutasas), contenido de ferritina, y potencial antioxidante total del LCR.

En el análisis y comparación de los datos obtenidos, se ha tenido en cuenta la edad de los sujetos así como el grado evolutivo neuroclínico y motor en la Enfermedad de Parkinson.

Los resultados indican que durante el Envejecimiento Normal no se alteran en el LCR los niveles de factores neurotróficos estudiados. Tan solo encontramos reducida en el LCR la actividad enzimática de la glutación-S-transferasa en el grupo de sujetos con Envejecimiento Avanzado, sin afectarse la actividad de las otras enzimas antioxidantes, ni factores tróficos ni potencial antioxidante.

Sin embargo, en el LCR de los sujetos con Deterioro Cognitivo Leve los resultados muestran reducción significativa de los niveles de BDNF, de la actividad de glutación-S-transferasa y del potencial antioxidante .

En la Enfermedad de Parkinson los resultados indican que, entre los factores neurotróficos valorados en el LCR, solo los niveles de TGF β 1 se vieron aumentados y de forma mas marcada en los sujetos con mayor grado evolutivo de la enfermedad. Respecto a la actividad enzimática, glutación-peroxidasa, catalasa y peroxirredoxinas, muestran menores valores de actividad, así como el contenido de ferritina y el potencial antioxidante total del fluido.

Con estos resultados podemos concluir que existe un adecuado soporte neurotrófico y estado redox en el LCR durante el Envejecimiento Normal y solo en los sujetos mayores de 74 años se afecta ligeramente la eficacia antioxidante. Sin embargo, en los sujetos con Deterioro Cognitivo Leve el LCR muestra mayores cambios oxidativos y tróficos que en los sujetos con Envejecimiento Normal. El LCR de los sujetos con Enfermedad de Parkinson no revela déficit del soporte neurotrófico, salvo aumento de los niveles de TGF β 1 correlacionados de forma positiva con el curso evolutivo de la enfermedad, así como una seria alteración de estado redox, con presencia de estrés peroxidativo..

CAPITULO I – INTRODUCCIÓN

1.1 EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

El líquido cefalorraquídeo (LCR) es una solución compleja, clara e incolora, de aspecto similar al agua destilada y que baña al encéfalo y a la médula espinal. Toda la cavidad que encierra el encéfalo y la médula espinal, formada por el cráneo y el canal vertebral, tiene una capacidad de unos 1.600 a 1.700 mililitros, de los cuales unos 150 mililitros están ocupados por el LCR y el resto por el encéfalo y la médula. El cerebro y la médula espinal están recubiertos por las meninges, compuestas por tres capas que desde adentro hacia afuera son la piamadre, la aracnoides y la duramadre. La capa exterior externa es la duramadre que recubre el cráneo y el canal vertebral. La aracnoides es una membrana interna filamentosa (similar a una tela de araña). La piamadre es una membrana delgada que reviste las superficies del cerebro y la médula espinal. (Strasinger SK-Di Lorenzo, 2010). El LCR circula por el **espacio subaracnoideo**, en unos 120 mililitros, localizado entre la aracnoides y la piamadre y rodeando al encéfalo y la médula espinal en toda su integridad.

Este LCR está presente además de en espacio subaracnoideo, alrededor del encéfalo y la médula espinal, en los ventrículos cerebrales y en las cisternas que rodean por fuera el encéfalo, en un volumen de unos 30 mililitros. Todas estas cavidades se encuentran conectadas entre sí, y la presión del líquido se mantiene a un nivel sorprendentemente constante (Guyton y Hall, 2011).

El LCR es fundamental para el organismo y en él destacan tres funciones vitales:

1.- Protección mecánica del sistema nervioso central actuando como amortiguador de la sólida bóveda craneal.

2.- Mantenimiento del medio interno como vehículo para sustancias neuromoduladoras involucradas en la regulación de las funciones vitales como quimiorreceptores y hormonas de la neurohipófisis e hipotálamicas.

Es un vehículo de protección inmunológica (celular y humeral) para el sistema nervioso central y desempeña un papel nutricional como transportador de nutrientes, teniendo en cuenta que el tejido endotelial, pia madre y aracnoides son avasculares, y proporciona un sistema fisiológico para eliminar los desechos metabólicos (Guyton 2006)

3.- Mantenimiento de volumen, circulando entre el cráneo y la médula espinal para compensar los cambios de volumen de sangre intracraneal, influyendo en que la presiones de la cavidad craneal y medular sean igualadas y mantenidas dentro de límites fisiológicos (Sevillano García et al, 2011).

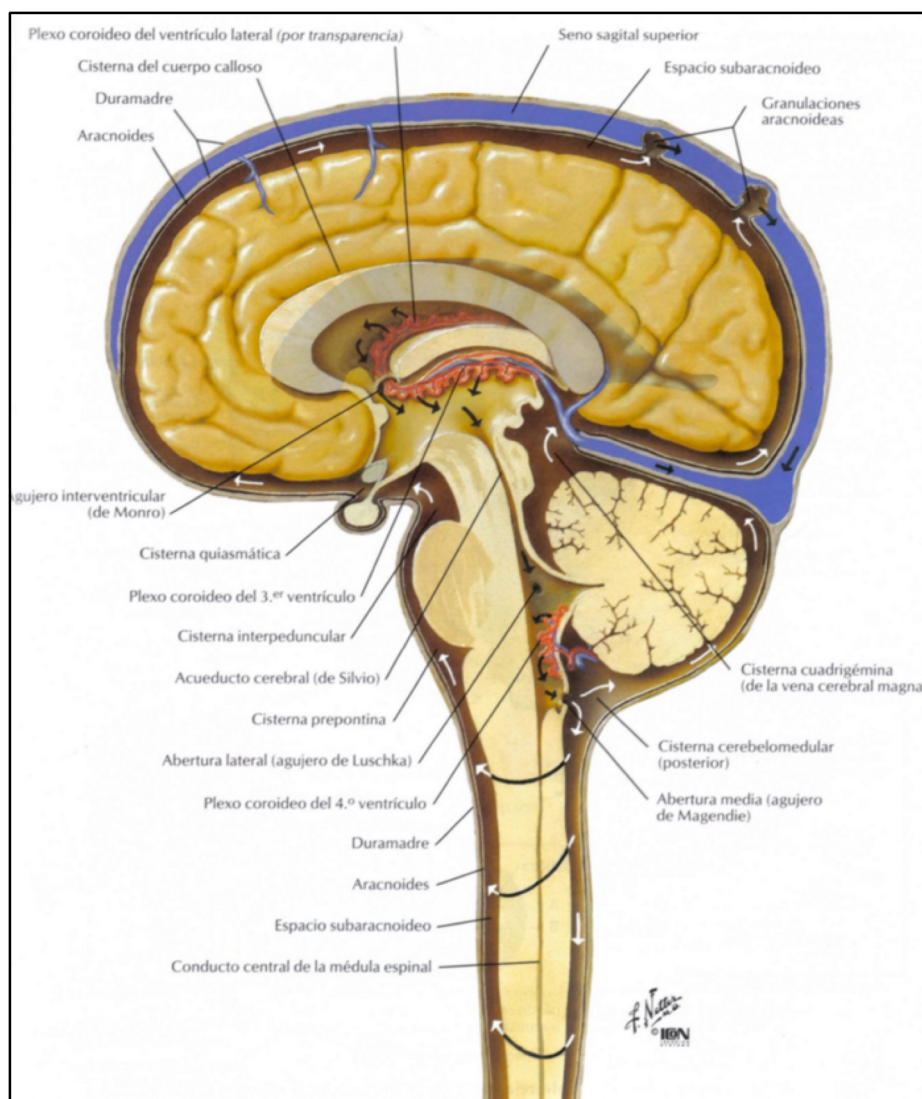


Figura 1 Circulación del líquido cerebroespinal (cefalorraquídeo).
Tomado de F. H. Netter. Atlas de Anatomía Humana. Masson: Barcelona, 3ª Edición, 2003.

El término Líquido Ceforraquídeo fue acuñado por el fisiólogo francés Magendie en el año 1.825. Existen referencias históricas de que en el antiguo Egipto se sabía que el líquido ceforraquídeo envolvía el cerebro. En el siglo XVI Vesalio realizó la primera descripción de su presencia en las cavidades ventriculares. En 1.692 Antonio Valsalva y un siglo después Doménico Cotugno en 1704 describieron la continuidad del sistema ventricular y subaracnoideo. En 1.827 François Magendie hizo la primera descripción completa del LCR incluyendo su producción y reabsorción. En 1.891 el médico alemán Heinrich Quinke realizó la primera punción lumbar y estudió la presión del LCR y sus variaciones junto a Hans Queckenstedt. En 1.912 Mestrezet, Sicard y Guillaín describieron la composición química del LCR, y Widal, Sicard y Ravaut su citología. En 1.918 el cirujano Walter Dandy realizó la primera ventriculografía y en 1.920 realizó la primera punción cisternal.

El LCR se forma a una velocidad de unos 500 mililitros diarios, unos 20 ml/h en adultos, esto es el triple o el cuádruple de su volumen total en todo el sistema, lo que indica que es renovado cada 6 a 8 horas. Alrededor de dos tercios o más de esa cantidad se debe a la secreción en los **plexos coroideos** en los cuatro ventrículos, sobre todo en los dos ventrículos laterales. Un 30% se produce en la superficie ependimaria de todos los ventrículos y en la aracnoides. Un pequeño porcentaje procede del propio encéfalo a través de los espacios perivascuales que quedan alrededor de los vasos sanguíneos que atraviesan el encéfalo (Guyton y Hall 2011)

En su circulación por el espacio subaracnoideo, el LCR es segregado en los ventrículos laterales, comunicados entre sí y con el tercer ventrículo por el foramen interventricular de Monro. Tras la incorporación de una mínima cantidad más en esta cavidad, desciende a lo largo del acueducto de Silvio hacia el cuarto ventrículo donde aún se añade otra minúscula proporción de LCR. Finalmente, sale del cuarto ventrículo hacia el conducto central de la médula espinal y por tres pequeños orificios, los dos agujeros laterales de Luschka y el agujero central de Magendie hacia la cisterna pontina y hacia la cisterna magna, un espacio de líquido que queda detrás del bulbo raquídeo y debajo del cerebelo.

Ambas cisternas de la base del cerebro comunican libremente con el espacio subaracnoideo medular, pero la circulación principal del líquido sigue en el espacio subaracnoideo cerebral hacia arriba, a través del agujero de la tienda cerebelosa, y después, sobre los hemisferios cerebrales. De esta forma, el LCR entra en contacto con las células nerviosas de la corteza y los ganglios basales (Ganong, 2004).

La secreción de líquido hacia los ventrículos por el plexo coroideo depende sobre todo del transporte activo de iones sodio a través de las células epiteliales que tapizan su parte externa. La composición final del LCR difiere del plasma, con presión osmótica aproximadamente igual a la del plasma y concentración sodio también más o menos igual a la del plasma, ion cloruro en torno a un 15% mayor que en el plasma, iones potasio alrededor de un 40% menor y glucosa alrededor de un 30% menor.

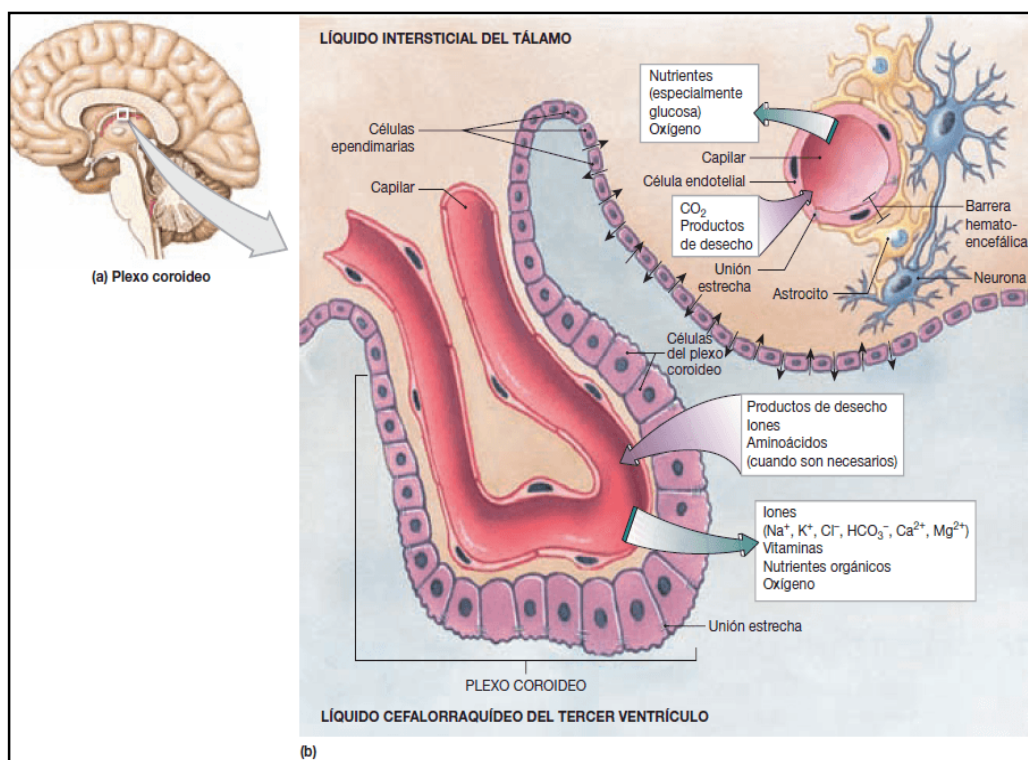


Figura 2 Estructura de los plexos coroideos e intercambio en la barrera hematoencefálica. También se representa el intercambio capilar hematológico. Tomado de Martini, Timmons y Talitsch. The Nervous System: The brain and cranial nerves. Human Anatomy. Napa Valley College, 2006.

El LCR se absorbe desde el espacio subaracnoideo cerebral a través de las **vellosidades aracnoideas** hacia los senos venosos duros (el gran seno venoso sagital superior y otros senos venosos cerebrales). Estos senos desembocan directamente en el torrente sanguíneo. Por tanto, todo el LCR sobrante se vierte hacia la sangre venosa a través de los poros de estas vellosidades aracnoideas que actúan como válvulas que permiten el flujo de volumen (flujo unidireccional) de LCR hacia la sangre venosa.

Con el microscopio electrónico se ha observado que las células endoteliales que cubren las vellosidades presentan pasadizos vesiculares directos a través de su soma con unas dimensiones suficientes como para permitir el flujo relativamente libre hacia la sangre venosa de LCR, moléculas proteicas disueltas y hasta partículas del tamaño de los glóbulos rojos y blancos. El flujo de volumen a través de estas vellosidades se aproxima a 500 mL diarios, con absorción de pequeñas cantidades de LCR por difusión hacia los vasos sanguíneos cerebrales. (Ganon, 2004)

Las grandes arterias y venas del encéfalo se hallan sobre la superficie de éste, pero su tramo final penetra hacia su interior, y arrastra una capa de piamadre. La piamadre está muy poco adherida a los vasos, por lo que existe un espacio, el espacio peri vascular, entre ella y cada vaso. Así pues, los **espacios perivasculares** siguen a las arterias y las venas hacia el encéfalo hasta llegar a las arteriolas y las vénulas, con lo cual, el espacio peri vascular es continuación del espacio subaracnoideo, en contacto por tanto con el LCR. Como sucede en cualquier otro punto del cuerpo, una pequeña cantidad de proteínas se filtra desde los capilares del encéfalo hacia sus espacios intersticiales. Dado que en el tejido cerebral no existen auténticos linfáticos, este exceso proteico sale contenido en el líquido a través de los espacios perivasculares hasta los espacios subaracnoideos. Al llegar a ellos, las proteínas pasan a circular con el LCR, para absorberse hacia las grandes venas cerebrales a través de las vellosidades aracnoideas. Por tanto, los espacios perivasculares en realidad constituyen un sistema linfático especializado para el encéfalo. Estos espacios perivasculares, además de transportar líquido y proteínas, también sacan del encéfalo sustancias sólidas extrañas. Por ejemplo, siempre que hay una infección encefálica, los glóbulos blancos muertos y otros residuos infecciosos se expulsan por los espacios perivasculares.

Estas vellosidades permiten el flujo del LCR hacia el seno, impidiendo el flujo retrogrado. El proceso es pasivo y no requiere energía. La reabsorción de LCR es directamente proporcional a la presión del líquido. Su absorción se debe a diferencia de presión hidrostática entre los senos venosos y el LCR, y no a diferencia de presiones osmóticas.

La velocidad normal de formación de LCR permanece muy constante por lo que sus cambios rara vez constituyen un factor que influya en el control de la presión del sistema de LCR. La presión normal del LCR en la región lumbar es de 70 a 80 mm de LCR. El ritmo de formación del LCR depende de la presión intraventricular hasta cifras muy por arriba de éstas. No obstante, la absorción depende sobre todo del flujo de volumen y proporcional a la presión. Con una presión de 112 mm de LCR, que es promedio normal, la formación y la absorción son iguales. Por debajo, en una presión cercana a 68 mm de LCR, la absorción se detiene. (Figura 3) (Ganon, 2004)

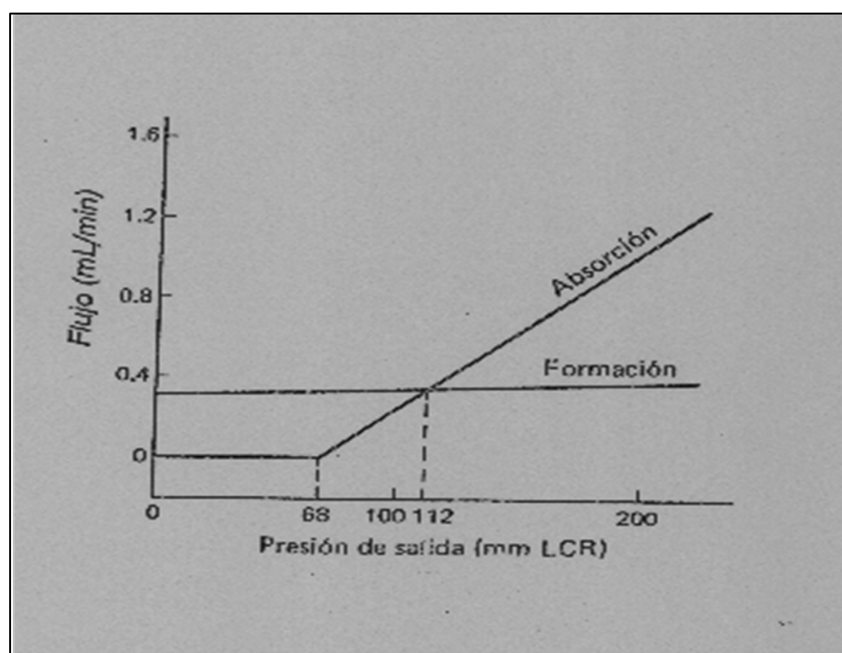


Figura 3 Flujos de formación y absorción del LCR dependiendo de la presión del LCR. Tomado de W.F. Gannong. Fisiología médica. 2004. 21ª Edición.

Normalmente, esta acción valvular de las vellosidades deja que el LCR comience a fluir hacia la sangre cuando su presión supera en unos 15 milímetros de mercurio la presión de la sangre en los senos venosos. Después, si la presión del LCR todavía sube más, las válvulas se abren con mayor amplitud, por lo que, en condiciones normales, esta variable casi nunca asciende más que unos pocos milímetros de mercurio por encima de la presión del interior de los senos venosos cerebrales. Por el contrario, en los estados patológicos, a veces las vellosidades quedan bloqueadas por grandes partículas sólidas, por una fibrosis o por un exceso de células sanguíneas que se hayan filtrado hacia el LCR en el caso de una enfermedad cerebral. Cuando disminuye la capacidad de absorción de las vellosidades aracnoideas se acumulan grandes cantidades de líquido (hidrocefalia externa o hidrocefalia comunicante). El líquido también se acumula en sitios proximales al bloqueo y distiende los ventrículos cuando los agujeros de Luschka y de Magendie se obstruyen o cuando hay un bloqueo dentro del sistema ventricular (hidrocefalia interna, hidrocefalia no comunicante) (Guyton y Hall 2011).

La concentración de varios componentes importantes del LCR no coincide con la concentración en el líquido extracelular en cualquier otro punto del organismo. Además, muchas sustancias moleculares grandes apenas consiguen pasar desde la sangre hacia el LCR o hacia los líquidos intersticiales del encéfalo, aunque estas mismas sustancias salen con facilidad hacia los líquidos intersticiales habituales del organismo. Por tanto, se dice que existen barreras, llamadas **barrera hematocefalorraquídea (BHC) y barrera hematoencefálica (BHE)** que separan la sangre del LCR y del líquido encefálico respectivamente.

En general, las BHC y BHE son muy permeables al agua, al dióxido de carbono, al oxígeno y la mayoría de las sustancias liposolubles como el alcohol y los anestésicos; parcialmente permeables a electrolitos como el sodio, el cloruro y el potasio, y casi totalmente impermeables a las proteínas plasmáticas y a la mayor parte de las moléculas orgánicas grandes no liposolubles. La causa de la baja permeabilidad que presentan las BHC y BHE radica en el modo como están unidas entre sí las células endoteliales de los capilares en el tejido cerebral, mediante las denominadas “*uniones intercelulares herméticas o estrechas*”. Esto es, las membranas de las células endoteliales adyacentes están íntimamente fusionadas en vez de poseer grandes poros

de hendidura entre ellas, como es el caso en la mayor parte de los demás capilares del organismo. Es esencial mantener la integridad de la BHE para proteger al cerebro de las sustancias químicas y de otro tipo que circulan en la sangre y podrían dañar el tejido cerebral. Las uniones evitan también el paso de sustancias útiles como los anticuerpos y algunos fármacos. La alteración de la BHE por enfermedades, como la meningitis o la esclerosis múltiple, permite que los leucocitos, las proteínas y otras sustancias químicas ingresen en el LCR (Ganon, 2004).

El encéfalo y el LCR poseen aproximadamente la misma densidad específica (tan solo difiere en un 4% más o menos) de modo que el encéfalo se limita a flotar en el seno del líquido; en esto se basa una de las funciones más importantes del LCR consistente en amortiguar el encéfalo dentro de su bóveda sólida. El cerebro pesa cerca de 1.400 g al aire, pero en su “baño” de LCR tiene un peso neto de solo 50 g. La flotación de cerebro en el LCR permite que sus uniones relativamente endebles, como los vasos sanguíneos, raíces nerviosas y trabéculas aracnoideas fibrosas, lo suspendan de manera muy efectiva. Cuando la cabeza recibe un golpe, la aracnoides se desliza sobre la duramadre y el cerebro se mueve, pero este movimiento se amortigua por el LCR y por sus trabéculas aracnoideas.

EL LCR actúa como colchón mecánico, absorbiendo y distribuyendo la fuerza de un golpe en la cabeza, aportando así una protección considerable a cerebro y bulbo. Un golpe en la cabeza, si no es demasiado fuerte, desplaza todo el encéfalo a la vez que el cráneo, lo que evita que cualquier porción del encéfalo sufra una torsión transitoria por la acción del golpe. (Ganon, 2004).

El LCR se obtiene comúnmente para su estudio mediante punción lumbar (PL). También se puede obtener por punción cisternal o punción ventricular considerándose estas dos últimas técnicas neuroquirúrgicas.

La PL consiste en el acceso desde la piel de la región lumbar hasta el espacio subaracnoideo del canal vertebral que protege a la medula espinal mediante una aguja a través de la cual fluye el LCR, debiendo realizarse con las medidas de asepsia de todo procedimiento invasivo.

La medula espinal, es una masa cilíndrica de tejido nervioso, de una longitud en adultos de 42 a 45 centímetros, que ocupa los dos tercios superiores del canal vertebral. Por el extremo cefálico se continua con el bulbo raquídeo y por abajo se extiende hasta el borde superior de la vértebra lumbar L1. Del extremo cónico inferior, el cono medular, se desprende un filamento delicado, el filamento terminal, que se fija por abajo al primer segmento del cóccix. A la médula espinal se fijan 31 pares de nervios espinales, cada uno de los cuales nacen de una raíz posterior y otra anterior. Estas raíces anteriores y posteriores cruzan el espacio subaracnoideo, atraviesan la duramadre y el espacio extradural independientemente, y se unen en el agujero intervertebral para formar los troncos nerviosos.

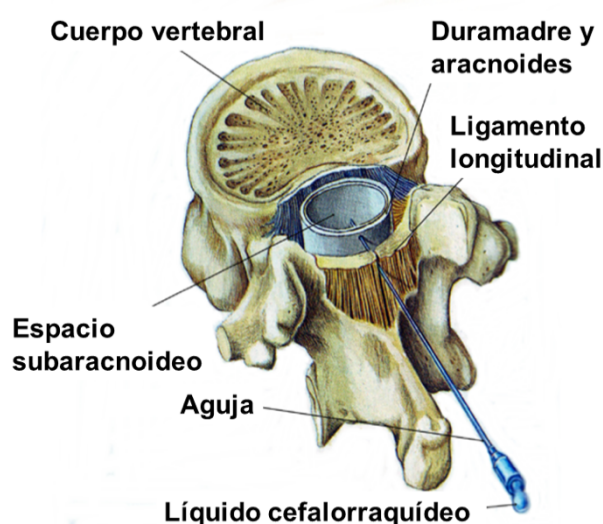


Figura 4 Punción Lumbar: elementos involucrados. Tomado de Macintosh R. Punción lumbar y analgesia espinal. 2ª Edición. Salvat, 1981.

La punción se practica en un espacio interespinalo lumbar inferior al de las vértebras lumbares L2-L3, ya que el cono medular, en la mayoría de los casos, termina entre la mitad y el borde inferior del cuerpo vertebral L2, previniendo con ello su lesión por punción accidental. Se suele acceder por el espacio lumbar que se encuentra en la intersección de la línea que forman las apófisis espinosas y la línea que une ambas crestas ilíacas, ya que suele ser el espacio lumbar de mayor amplitud y facilita la punción. La PL se puede realizar con el paciente en posición sentado o en decúbito lateral (Macintosh et al. 1988).

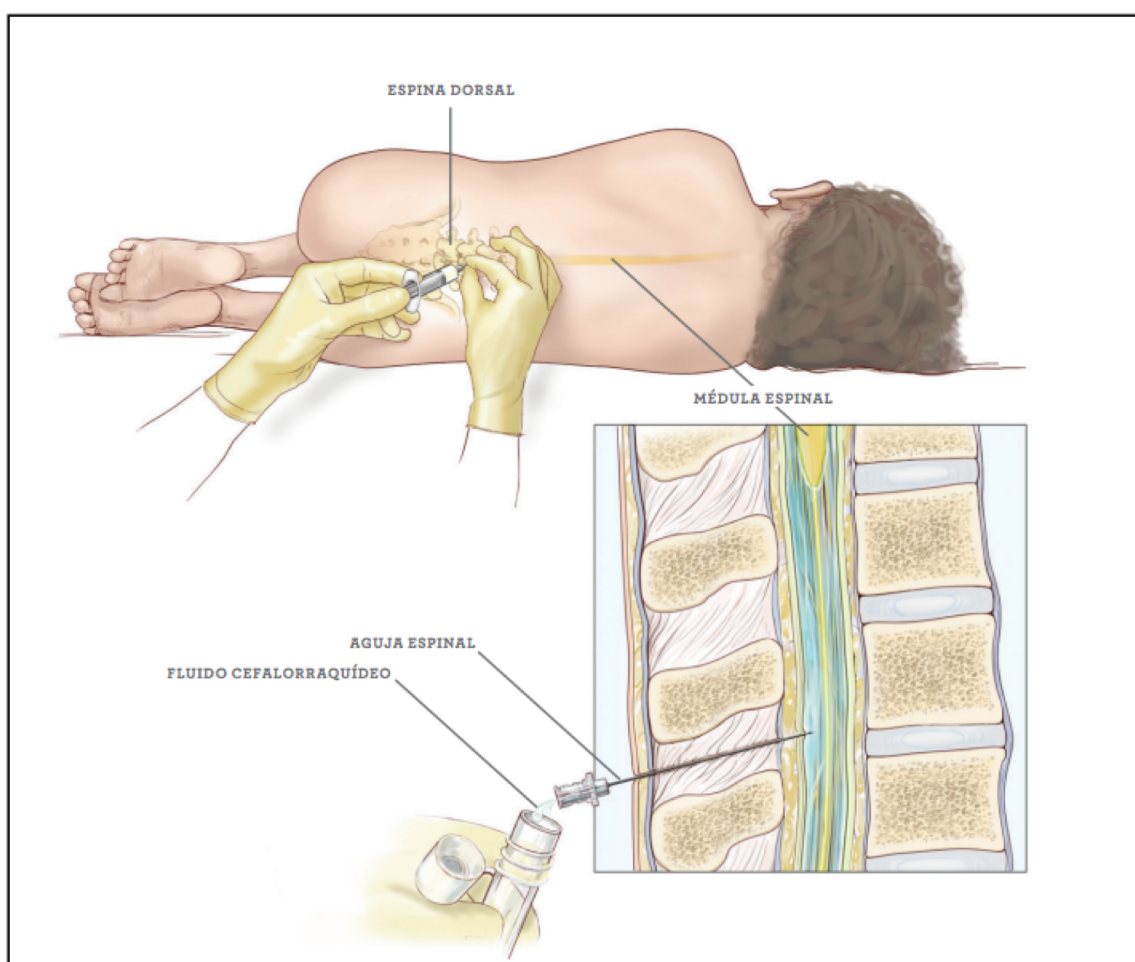


Figura 5 Punción lumbar y recogida de LCR. Tomado de Winslow T. Medical and scientific illustration, 2007.

En la posición sentada, los miembros inferiores cuelgan del borde lateral de la camilla de forma que corte perpendicularmente la línea que une las apófisis espinosas asegurándonos que la espina dorsal no experimente ninguna rotación que pueda dificultar la PL. Una vez lograda la posición con un ayudante frente al paciente, esta cruza ambos brazos sujetándose los hombros con sus manos y flexiona toda la columna vertebral apoyando la mandíbula sobre su pecho para abrir al máximo los espacios intersepinosos y facilitar la PL. En la posición en decúbito lateral, la camilla debe estar en perfecta horizontalidad de modo que la línea que une ambas crestas ilíacas este perpendicular a la cama, con flexión de los muslos del paciente sobre su abdomen de modo que las rodillas estén en contacto entre si y simétricas, lo más cerca posible junto al abdomen, asistido por el ayudante que aquí también se ubica frente al paciente.

La aguja utilizada para PL suele ser de un calibre entre 20 y 25 gauge y una longitud de 50 a 60 milímetros y puede tener al final una punta en bisel cortante o en punta de lápiz con orificio lateral menos traumática. La aguja va provista de un mandril interno para evitar su obstrucción el cual se retira una vez atravesada la duramadre para permitir la salida espontánea del LCR. Anatómicamente la aguja en su recorrido hacia el espacio subaracnoideo hasta encontrar el reflujo de LCR atraviesa la piel, el tejido subcutáneo, el ligamento amarillo, los ligamentos interespinosos, el espacio epidural y la duramadre. Al atravesar la duramadre con la aguja se percibe el chasquido de apertura de esta membrana. Se colecta el LCR gota a gota en un volumen y en distintos tubos secos en función de las necesidades del laboratorio. Se retira la aguja haciendo una cura plana del plano de punción y colocando un apósito estéril. Como toda punción puede ser dolorosa, por lo que antes de realizarla, se puede infiltrar la piel y subcutáneo con dos centímetros cúbicos de anestésico local de vida media corta.

La pérdida de volumen de LCR por su extracción puede causar dolor por la falta de sostén del cerebro. La extracción de LCR durante la punción lumbar puede causar cefalea intensa ulterior porque el cerebro cuelga de los vasos y raíces nerviosas, y esta tracción estimula las fibras del dolor. El dolor se alivia con inyección intratecal de solución salina estéril (Gannong, 2004).

El análisis del LCR constituye una herramienta básica para el diagnóstico y seguimiento de algunas enfermedades neurológicas. Existe una íntima relación del LCR con el espacio extracelular del cerebro y la médula, por lo que la composición del LCR refleja la actividad normal y patológica del sistema nervioso central (Massaro et al, 1990). En apariencia, el LCR es claro e incoloro como el cristal. Se asemeja a agua destilada. El color y la claridad del tubo de la muestra debe compararse al lado de un tubo con agua frente a una hoja de papel limpia y blanca.

Normalmente no existen eritrocitos en el LCR. El valor de referencia de leucocitos en LCR es de 0 a 5 / μ l. La concentración de glucosa en LCR es un reflejo de la concentración en suero, ya que deriva del mismo por transporte a través de los plexos coroideos y también depende de la utilización craneal. De forma general la concentración de glucosa es aproximadamente de un 50-75% de la concentración en suero.

Tabla 1 Composición normal del LCR. Tomado de Reiber et al, 1992

Parametro		LCR	Plasma
Osmolalidad	mosm/l (37°C)	281,0	289,0
pH		7,31 \pm 0,028	7,39 \pm 0,017
PCO ₂	mmHg	49,5 \pm 2,37	39,1 \pm 1,87
HCO ₃ ⁻	mmol/l	22,7 \pm 1,15	23,67 \pm 0,98
Na ⁺	mmol/l	(138-150)	135-145
K ⁺	mmol/l	2,7-3,9	3,6-4,8
Mg ²⁺	mmol/l	0,38-1,4	1,8-2,6
Ca ²⁺ libre	mmol/l	1,05-1,35	1,15-1,35
Cl ⁻	mmol/l	116-127	92-105
P inorgánico	mmol/l	1,1	0,84-1,45
Glucosa	mmol/l	1,1-4,4 ¹	3,9-5,5
Lactato	mmol/l	1,2-2,1 ²	0,5-2,2
Oxalatos ³	μ mol/l	25,5 \pm 9,2	254,0 \pm 79
Aminoácidos totales	mmol/l	0,72	2,62
Lípidos totales	mg/l	19	7500

1 = Relación LCR/suero normal >0,7

2 = Valor independiente de la variación en suero

3 = Relación LCR/suero normal = 0,1 \pm 0,023 (correlación lineal con Qalb).

Al igual que en el suero, existe en el LCR una variedad de proteínas en diversas concentraciones. La composición proteica del LCR es compleja. Aproximadamente un 80% de las proteínas del LCR proceden del plasma, principalmente por mecanismos de difusión pasiva. También existen mecanismos de transporte activo. El paso de proteínas desde el plasma hacia el LCR depende de las constantes físico-químicas de la proteína (radio y masa molar, carga eléctrica), de su concentración plasmática y del estado funcional de la BHE. El 20% restante de proteínas del LCR se origina por síntesis intratecal. Dado que las proteínas provienen principalmente del plasma por difusión pasiva, las proteínas que predominan en LCR son las de baja masa molar. El efecto final de la BHE es el de mantener una concentración de proteínas en LCR de 1/350 la del plasma (Thomson, 1990). El contenido normal de proteínas en el suero del adulto es alrededor de 7.000 mg/dl y el contenido normal de proteínas en LCR es de 35 mg/dl., lo que indica que el porcentaje de proteína que pasa del plasma al LCR es del 0,5%. (Thomson, 1988).

La electroforesis de las proteínas del LCR revela un espectro diferente a la del suero con la presencia de una banda de prealbúmina prominente y dos bandas de transferrina. Esta técnica también puede identificar la presencia de bandas oligoclonales de inmunoglobulinas (Takeoka et al, 1980).

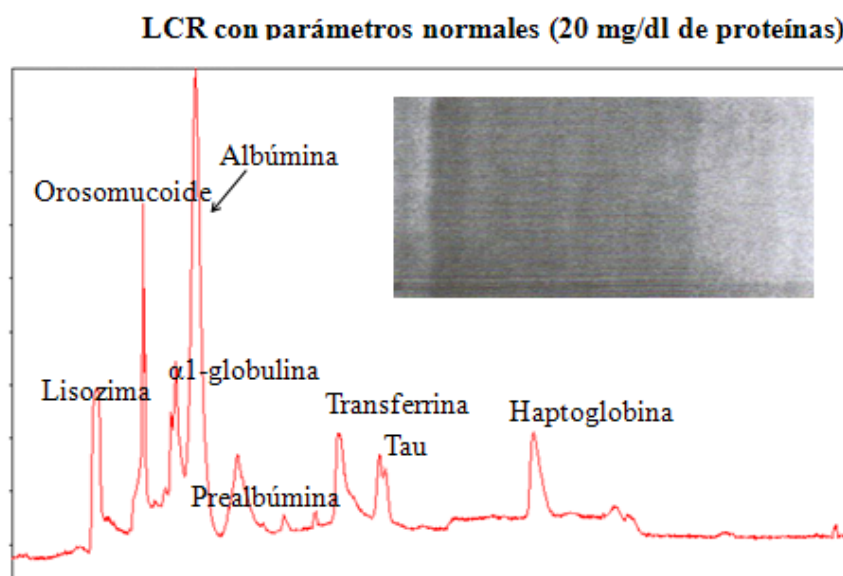


Figura 6 Electroforesis normal del LCR. Se representan las bandas proteicas principales. Tomado de Macintosh R. Punción lumbar y analgesia espinal. 2ª Edición. Salvat, 1981.

La prealbúmina es una proteína de baja masa molar, que se puede encontrar en LCR por paso desde el plasma y por síntesis a nivel de los plexos coroideos ventriculares, por lo que su concentración relativa (con relación a la proteína total) es mayor en LCR que en plasma u otros líquidos biológicos. Durante mucho tiempo, la prealbúmina se ha utilizado para confirmar las pérdidas de LCR ya que una proporción elevada de prealbúmina respecto a la proteína total en el fluido analizado constituye un criterio a favor de que la muestra remitida para estudio está contaminada con LCR. Actualmente, la utilización de la prealbúmina se ha visto desplazada por la determinación de la transferrina-t (Thomson, 1990). La isoforma de transferrina (TRF) mayoritaria tanto en suero como en LCR es la TRF nativa, o TRF tetrasializada, con movilidad electroforética beta1. La TRF-t es una forma de TRF desializada presente en LCR, ya sea por acción de una neuroaminidasa del SNC, ya sea por síntesis intratecal.

La concentración de TRF-t representa de un 15 a un 20 % del total de TRF en LCR. Puesto que la TRF-t no se encuentra normalmente en suero, la presencia de TRF-t en una secreción debe hacer pensar en una posible contaminación por LCR. La diferencia del LCR con posibles secreciones, de los lagrimales, nasales o de glándulas serosas, es que en el LCR está presente la isoforma desializada de la transferrina (proteína tau, β_2 -transferrina), mientras que prácticamente no se detecta en las secreciones serosa nasales, saliva, lágrimas y sudor (Valdecabres Ortiz et al, 2014)

El análisis proteico del LCR tiene un papel importante para excluir o confirmar algunas condiciones neurológicas, así como para el seguimiento clínico de los pacientes (Seyfert et al. 2002). Las alteraciones en la concentración de las proteínas en LCR son debidas básicamente a un aumento del paso de proteínas desde el plasma hacia el LCR, o bien a un aumento de síntesis o de liberación de proteínas.

El estudio proteico en LCR es útil en el diagnóstico y seguimiento de procesos neurológicos para evaluar el grado de afectación de la BHE, en la detección de procesos que impliquen una respuesta inmune en el SNC y en procesos degenerativos-destructivos del SNC, en los cuales existe una liberación de proteínas específicas desde el SNC hacia el LCR. (Thomson, 1990)

Diversos procedimientos, como la electroforesis bidimensional, empleados en los últimos años en el ámbito de la investigación, han permitido la detección e identificación de una amplia gama de proteínas y péptidos en el LCR. A su vez, algunos de ellos han podido asociarse a determinados procesos neurológicos y neuropsiquiátricos, y han contribuido a establecer su etiología a la vez que han proporcionado nuevos datos útiles para su diagnóstico y seguimiento: proteína beta-traza, proteína C reactiva, Cistatina, beta-2 microglobulina, alfa-2 macroglobulina, proteína beta amiloidea, proteína tau, proteína tau fosforilada, cadena Kappa libre (Valdecabres Ortiz et al, 2014).

Fracción	% respecto a proteína
Prealbúmina	2 - 7
Albumina	56 - 76
α_1 -globulina	2 - 7
α_2 -globulina	4 - 12
β -globulina	8 - 18
γ -globulina	3 - 12

Tabla 2 Valores de referencia de electroforesis proteica en LCR. Tomado de Recomendaciones para el estudio de las proteínas del líquido cefalorraquídeo. Recomendación (2014). Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología

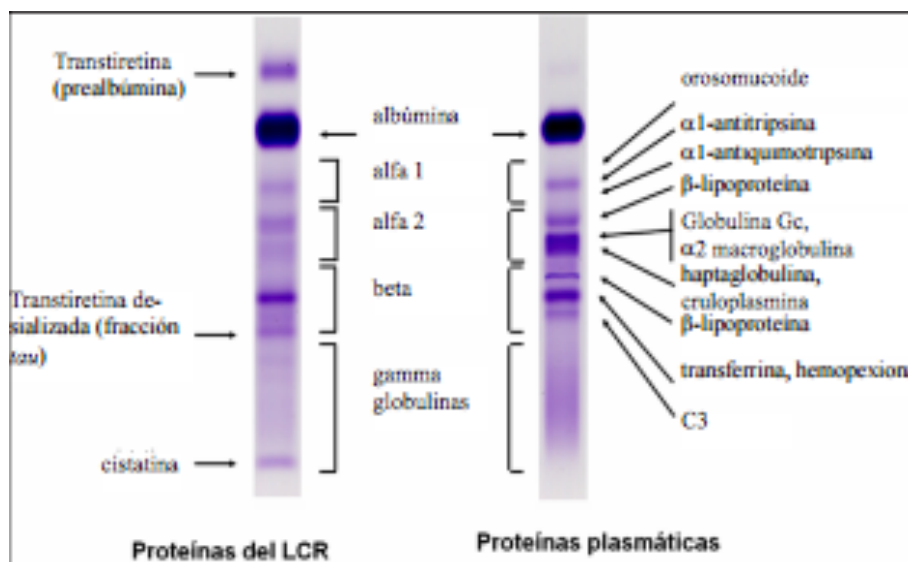


Figura 7 Comparación del patrón electroforético de los proteinogramas séricos y del LCR. Tomado de Recomendaciones para el estudio de las proteínas del líquido cefalorraquídeo. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, 2014.

Para la evaluación de la integridad de la BHE, puede utilizarse clínicamente la concentración diferencial de proteínas en el LCR y en el suero, ya que la BHE limita el paso de proteínas del plasma al LCR. Aunque un aumento en la concentración de proteína en LCR puede indicar una alteración de la BHE, la albúmina constituye un buen marcador del intercambio entre LCR y plasma debido a su baja masa molar y a su capacidad de difusión a través de la BHE. Además, se puede medir su concentración con mejor exactitud que los utilizados para la concentración de proteína. Los valores de referencia de la concentración de albúmina en LCR oscilan entre 120 y 320 mg/L. Puesto que la albúmina es de síntesis hepática, toda la albúmina presente en LCR procede del plasma. Por lo tanto, la relación entre las concentraciones de albúmina en LCR y en plasma (índice de albumina) refleja la integridad de la BHE.

$$\text{Índice albumina} = \frac{\text{albumina LCR (mg/L)}}{\text{albumina suero (g/L)}}$$

El índice albumina menor o igual a 9 es consistente con una BHE intacta, si oscila entre 9 y 14 indica un ligero compromiso de la BHE, de 14 a 30 un compromiso moderado y de 30 a 100 un compromiso severo. Valores superiores a 100 indican pérdida de la integridad anatómica y funcional de la BHE.

En condiciones normales, las inmunoglobulinas del LCR son mayoritariamente de procedencia plasmática, siendo su síntesis local (intratecal) muy baja (3 mg/día). La concentración de inmunoglobulina G (IgG) en LCR es normalmente inferior a 40 mg/L y la de las otras clases de inmunoglobulinas muy inferior. Los aumentos de la concentración de inmunoglobulinas en LCR pueden acontecer por aumento de inmunoglobulinas en el suero, con el paso de las mismas hacia el LCR, aun estando la BHE intacta, o por alteración de la BHE, con mayor paso de inmunoglobulinas desde el plasma. El aumento de síntesis local (infecciones o inflamaciones agudas o crónicas, enfermedades desmielinizantes y autoinmunes) también puede aumentar su concentración en el LCR. Para establecer la procedencia de las inmunoglobulinas cuantificadas en el LCR, se puede recurrir al índice de IgG.

$$\text{Índice IgG} = \frac{\text{IgG LCR}}{\text{IgG suero}}$$

Un índice de IgG mayor de 0,003 es consistente con una síntesis intratecal elevada de inmunoglobulinas. Sin embargo, este cociente no tiene en cuenta la filtración de la BHE.

La razón de IgG, descrita por Tourtellotte en 1971, representa el cociente entre las concentraciones de IgG y de albúmina en LCR. Se asume que un aumento de la permeabilidad de la BHE conduce a un aumento proporcional en LCR tanto de albúmina como de IgG. Por lo tanto, la razón no debería modificarse ante alteraciones aisladas de la permeabilidad de la BHE. Contrariamente, en caso de la existencia de un aumento de síntesis intratecal de inmunoglobulinas la razón aumenta. El valor de esta razón en adultos sanos es de hasta 0,25; valores por encima de 0,27 son indicativos de síntesis intratecal de IgG.

$$\text{Razón de IgG} = \frac{\text{IgG LCR(mg/L)}}{\text{Alb LCR(mg/L)}}$$

Existen sin embargo situaciones en que se dan simultáneamente alteraciones de permeabilidad de la BHE y aumento de síntesis intratecal de inmunoglobulinas. Para discriminar correctamente si el aumento de concentraciones de IgG en LCR es debido al primer proceso o al segundo, se dispone del **Índice de Tibbling-Link**. El índice de Tibbling-Link establece una corrección para eliminar la contribución o el efecto del paso de las inmunoglobulinas hacia el SNC en condiciones de funcionamiento normal de la BHE, teniendo en cuenta a la vez el paso de proteínas por alteración de la barrera.

$$\text{Índice de Tibbling – Link} = \frac{\text{IgG LCR(mg/L)} * \text{Alb suero (g/dL)}}{\text{IgG suero(mg/dL)} * \text{Alb LCR(mg/L)}}$$

El intervalo de referencia del índice de Tibbling-Link se sitúa entre 0,3 y 0,7; valores superiores a 0,7 indican aumento de síntesis intratecal de inmunoglobulinas. Con este cálculo, al incorporar la concentración de albumina, se corrige la pérdida de proteínas por la BHE. El intervalo de referencia habitual es de 0,3 a 0,7. Se considera que un índice de Tibbling-Link mayor a 0,7 es consistente con una síntesis intratecal aumentada de inmunoglobulinas.

El LCR se encuentra en íntimo contacto con el tejido nervioso, y es un excelente **“testigo” de neuropatologías** (Kroksveen et al, 2011). Durante su flujo a través del sistema cerebro ventricular “recluta” proteínas del margen endotelial y de las membranas pia madre y aracnoides, y además del intercambio con el tejido nervioso vecino (Kroksveen et al., 2011).

. El LCR es una fuente ideal de biomarcadores debido a su interacción directa con el espacio extracelular del encéfalo. Un biomarcador se define como una molécula o característica clínica que puede medirse de una forma objetiva y válida, y que sirve como indicador de un proceso biológico normal o patológico, o una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica (Biomarkers Definition Working Group, 2001)

Las alteraciones en los niveles de diferentes proteínas en el LCR se consideran un reflejo de las alteraciones bioquímicas y neuropatológicas desarrolladas en el cerebro a lo largo de la enfermedad. Este es el concepto de ***“LCR como testigo de enfermedad neurológica”***.

El diagnóstico de las enfermedades neurodegenerativas está sustentado en criterios clínicos, cuya sensibilidad es elevada para distinguir entre controles y sujetos con la enfermedad. Sin embargo, su especificidad es moderada, por lo que la predicción de la neuropatología basada en la clínica es baja. Las características clínicas se solapan entre distintas enfermedades y además no es infrecuente la coexistencia de distintos procesos patológicos en un mismo paciente. El avance en el conocimiento de la biología de las enfermedades neurodegenerativas ha favorecido **el desarrollo clínico de biomarcadores en el LCR que permitan un diagnóstico temprano, monitoricen la progresión de la enfermedad y puedan servir para la evaluación de las terapias**. La aplicabilidad clínica se encuentra limitada por la necesidad de un procedimiento invasivo, y de un protocolo y adiestramiento técnico en la determinación de marcadores específicos. La tecnología de medida todavía no está estandarizada a nivel global y la variabilidad entre centros es alta. Sin embargo, en casos clínicos seleccionados y en la investigación de la patogénesis de algunas enfermedades degenerativas, los biomarcadores del LCR juegan un papel importante.

En los últimos años, los biomarcadores proteicos basados en el LCR han demostrado ser una herramienta útil para el manejo diagnóstico de enfermedades

neurodegenerativas, sobretodo la Enfermedad de Alzheimer (EA), incluso antes de que estas produzcan un síndrome clínico de demencia.

Los biomarcadores más estudiados en LCR son el péptido de 42 aminoácidos de betaamiloide ($A\beta_{42}$), la concentración total de proteína tau (tT) y la concentración de proteína tau fosforilada (pT).

Sus sensibilidades y especificidades están prácticamente definidas tanto en sujetos con diagnóstico clínico como en estudios con confirmación anatomopatológica. No obstante, el análisis del $A\beta_{42}$ en el LCR no es sencillo. El rango esperable de su concentración es muy amplio, las concentraciones tienen una variación circadiana en el LCR, una vida media corta y capacidad para agregarse en materiales de recogida como el poliestireno. También pueden provocar una determinación anormal la presencia de un daño de barrera o una centrifugación que provoque una lisis celular. Los niveles de $A\beta_{42}$ se encuentran frecuentemente disminuidos en otras enfermedades neurodegenerativas tales como la demencia con cuerpos de Lewy, la esclerosis lateral amiotrófica y en la atrofia multisistémica, por lo que su especificidad es relativamente baja. También se encuentran niveles bajos en casos de meningitis bacterianas, de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y de panencefalitis esclerosante subaguda, aunque esto puede ser debido al daño de barrera que se produce. La tT se cree que es un marcador de neurodegeneración, aunque en diversas patologías neurodegenerativas su alteración es mínima. Está elevada de forma significativa en la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y se encuentra transitoriamente elevada tras un ictus agudo o demencia vascular. La pT añade mayor especificidad al diagnóstico de EA y no se modifica en caso de ictus, depresión mayor, demencia vascular o demencias frontotemporales. La combinación de biomarcadores en la EA tiene una sensibilidad y especificidad frente a otros tipos de demencia del 80-90%, lo que permite una mayor eficiencia diagnóstica de cada biomarcador por separado (García Ribas et al. 2011).

Los pacientes con Enfermedad de Alzheimer presentan un patrón de LCR bioquímico básico (niveles de proteínas totales, glucorraquia, etc.) normal, sin células. Sin embargo, en múltiples estudios se ha demostrado que los pacientes con EA presentan disminución de la concentración de la proteína $A\beta_{42}$ y un incremento de los

niveles de tau total y tau fosforilada en el LCR respecto a controles. La disminución de $A\beta_{42}$ en el LCR refleja el depósito de $A\beta_{42}$ en el cerebro.

El aumento de la proteína tau total en el LCR refleja destrucción neuronal y se correlaciona con la presencia de atrofia cerebral en los estudios de neuroimagen. En controles sin patología de EA, los niveles de $A\beta_{42}$ no se modifican de forma substancial con la edad, pero si los niveles de tau, que aumentan con la edad. La validez de estos marcadores bioquímicos para el diagnóstico clínico de la EA varia, siendo más útiles en su diferenciación frente a controles o frente a enfermedades no neurológicas (ej. Depresión) con una especificidad de un 90% , que frente a otro tipo de demencias, con una especificidad del 48-67%, dado que pacientes con demencia con cuerpos de Lewy y demencia vascular pueden presentar también valores alterados de estos marcadores bioquímicos, reflejando probablemente la frecuente coexistencia de patología de EA en los cerebros de estos pacientes asociadas a la edad. En este sentido la especificidad de los biomarcadores es mayor en pacientes menores de 65 años (Lladó y Sánchez-Valle, 2011).

La degeneración lobular frontotemporal es la tercera causa más común de demencia neurodegenerativa, después de la EA y la demencia con cuerpos de Lewy. Se caracteriza por atrofia o pérdida neuronal predominantemente localizada en lóbulos frontales y temporales que clínicamente se pueden presentar, según la sintomatología predominante, con trastorno conductual y cambio progresivo de la personalidad, afasia progresiva, demencia semántica y anomia. En el LCR, los niveles de $A\beta_{42}$ se encuentran dentro de la normalidad y los niveles de proteína tau ofrecen resultados contradictorios, sin embargo, el estudio de los niveles plasmáticos y en LCR de la proteína progranulina demuestran alta sensibilidad y especificidad (Lladó y Sánchez-Valle, 2011).

En la Enfermedad de Parkinson se ha estudiado la posible presencia de biomarcadores proteicos como la alfasinucleína o la TAU, aunque los resultados hasta ahora son de baja especificidad. También se ha relacionado con elevación de los productos de la oxidación avanzada de proteínas AOPP como principal marcador de la oxidación de proteínas, tal como ha descrito nuestro equipo de investigación (García-Moreno et al, 2013).

En el diagnóstico de la demencia, el uso de la evaluación de la proteína 14-3-3 en el LCR se ha considerado útil para confirmar o rechazar el diagnóstico de enfermedad de Creutzfeldt-Jacob. Concentraciones elevadas de esta proteína neuronal se ha encontrado que correlacionan razonablemente bien con el desarrollo de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob. Sin embargo, elevaciones de la proteína 14-3-3 en LCR también están presentes en casos de infarto y encefalitis y ocasionalmente con enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal, enfermedad de Lewy y meningitis carcinomatosa, de tal forma que la interpretación debe hacerse con cautela (Rodríguez-Segade, 2006). En el escenario de un tumor pineal con o sin tumor hipotalámico concomitante, el diagnóstico diferencial incluye un tumor germinal. Si la alfafetoproteína o la gonadotropina coriónica en suero no están claramente elevadas, es de interés su determinación en LCR para descartar claramente un tumor germinal.

1.2 FACTORES NEUOTRÓFICOS

Todos los tejidos y órganos de los animales vertebrados, incluyendo el hombre, regulan su crecimiento y mantenimiento a través de moléculas de señalización. Dichas señales son requeridas para la supervivencia de todas las células de los organismos pluricelulares, y su ausencia provoca en último término la muerte celular. Esas moléculas son los llamados factores tróficos. Los factores tróficos también llamados factores de crecimiento, son moléculas, generalmente proteínas, producidas por diferentes tipos celulares y actualmente se sabe que se sintetizan en todos los tejidos del organismo. Así, los factores tróficos que actúan sobre el sistema nervioso se denominan factores neurotróficos. Un mismo tipo neuronal puede responder a varios factores tróficos y un determinado factor neurotrófico puede afectar a distintos grupos de neuronas. En general, regulan toda la biología de la célula tanto en tejido embrionario en desarrollo como en tejido adulto. Durante el desarrollo están implicados en la proliferación, supervivencia, migración, diferenciación y establecimiento de conexiones intercelulares. En tejido adulto son imprescindibles para el mantenimiento de las funciones en general, incluyendo la conectividad, mielinización y regeneración celular.

En el cerebro existe una producción muy abundante de estos factores y se sabe que las células nerviosas están embebidas de un ambiente trófico durante toda su vida. Los factores tróficos participan tanto en la formación y en el desarrollo del sistema nervioso como en el mantenimiento de la estructura y función cerebral, llegando incluso a mediar en procesos de aprendizaje y memoria del individuo adulto. También es conocida su participación en procesos como depresión o neuroprotección.

El concepto de factor trófico surgió durante la década de los cincuenta a partir del hallazgo del primer factor de crecimiento denominado Factor de Crecimiento Nervioso (*Nerve Growth Factor*, NGF) (Levi-Moltancini R, 1987). Esta molécula era capaz de promover la supervivencia, el crecimiento neurítico y la producción de neurotransmisores de las neuronas simpáticas del sistema nervioso periférico. Se observó que era sintetizado por la célula diana y usado por la neurona aferente y que, en función de su disponibilidad, se modulaba el tamaño de dicha población aferente.

Hoy sabemos que los factores tróficos juegan un papel muy importante durante el proceso de muerte celular programada, regulando el número final de neuronas y conexiones del sistema nervioso y la formación de sus circuitos. Estos hallazgos llevaron a la formulación de la teoría trófica de las conexiones neuronales para explicar el proceso de muerte neuronal que ocurre en el sistema nervioso durante el desarrollo. Según esta teoría, durante el desarrollo se produce una sobreproducción de neuronas, y estas neuronas tienen que competir por concentraciones limitantes de factores tróficos secretados por el tejido diana. Las neuronas que consigan obtener las concentraciones suficientes y adecuadas de factores tróficos serán las que sobrevivan, mientras que las que no alcancen dichas cantidades o lo hagan de forma incorrecta morirán por muerte celular programada.

La teoría trófica implica que los factores tróficos ejercen su acción a través de un mecanismo retrogrado, mediante transporte desde la célula diana hasta el soma de la célula aferente, donde ejerce su acción. Además, se han documentado otros mecanismos de acción de los factores tróficos mediante un mecanismo anterógrado, a través del cual la neurona postsináptica recibe los factores tróficos de la neurona presináptica, o bien por mecanismo autocrino, en el que la misma célula sintetiza los factores tróficos y tiene receptores para ellos en su membrana plasmática.

También se ha descrito un mecanismo paracrino, en el que la célula que secreta el factor trófico está junto a la célula receptora, e incluso que los factores tróficos pueden ser vehiculizados por la sangre hasta una neurona sensible a ellos, mediante transporte endocrino.

Los factores tróficos son esenciales en el control de la muerte celular programada, y por tanto en la formación de los circuitos neuronales que definirán las funciones sensoriales, motoras y cognitivas, regulando todo el proceso del desarrollo neuronal. En las neuronas adultas, los factores tróficos son importantes en la activación de vías de señalización relacionadas con la supervivencia, la diferenciación neuronal o la plasticidad sináptica.

En muchos tejidos, la expresión de estos factores esta incrementada en respuesta al trauma, la inflamación, infección o crecimiento tumoral. Alteraciones en los niveles de factores tróficos tienen efecto en una variedad de fenómenos en los que se incluye el dolor, la agresividad, la depresión y el abuso de drogas. La interacción de los factores tróficos con sus respectivos receptores está implicada en los mecanismos que regulan la vulnerabilidad de las distintas poblaciones neuronales afectadas.

En las últimas décadas se han realizado avances significativos en el conocimiento del papel biológico de estos factores, su caracterización molecular y, así como sus mecanismos de señalización; sin embargo, poco se conoce sobre el papel que juegan los factores neurotróficos en las enfermedades neurodegenerativas. En enfermedades neurodegenerativas como la EP, la esclerosis lateral amiotrófica o el corea de Huntington se ha encontrado alteración en el patrón de expresión de factores neurotróficos o el de sus receptores. En la EP se han encontrado niveles excepcionalmente altos o bajos de algunos factores neurotróficos: TNF- α e interleukinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6) altos en estriado y TNF- α e IL-1 altos en la sustancia negra, además de niveles altos de TGF- α y TGF- β y niveles bajos de BDNF, NGF y GDNF en varias regiones cerebrales, entre ellas la sustancia negra. Incluso se han descrito niveles alterados en LCR, como descenso de BDNF y aumento de IL-8 (Zhang et al., 2008).

De entre los factores neurotróficos mejor caracterizados se encuentra la superfamilia de Factores Transformantes del crecimiento tipo beta (*Transforming growth factor- β o TGF β superfamily*) incluye una gran familia de proteínas reguladoras celulares que se relacionan estructuralmente con el factor **TGF β** . La superfamilia se divide al menos en tres familias de proteínas emparentadas entre sí: proteínas morfo génicas del hueso (*bone morphogenetic proteins, BNP*s), ligandos de la familia de Factores Gliales (familia GFL), y Factores Transformantes de Crecimiento (familia TGF).

La familia GFL está compuesta por el Factor Neurotrófico derivado de línea Glial o **GDNF** (*Glial cell line-derived neurotrophic factor*), neurturina (**NRTN**), artemina (**ARTN**), y persefina (**PSPN**), y se consideran como miembros lejanos de la superfamilia TGF β .

La familia TGF está constituida por proteínas de secreción que existen en tres isoformas llamadas **TGF β ₁**, **TGF β ₂** y **TGF β ₃**.

Todos estos factores mencionados están presentes en el cerebro de mamíferos (Unsicker et al. 1991), y se relacionan con funciones neuroprotectoras de neuronas dopaminérgicas (Lin et al. 1993; Kriegstein et al. 1998a, 1998b). Su déficit se ha relacionado tanto con el envejecimiento como la neurodegeneración dopaminérgica. Por ejemplo, en el envejecimiento hay un déficit de melatonina que repercute en una menor acción trófica de GDNF y TGF β ₁ (Phillipson, 2014). En la EP se cree que existe un déficit de GDNF que participa en la muerte neuronal progresiva (Akerud et al. 2002; Airaksinen y Saarma 2002)

Sin embargo, los factores mencionados de la familia TGF también podrían contribuir a la inflamación en el sistema nervioso, pues los **TGF β** per se son potentes reguladores de la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso (Wyss-Coray et al. 2001; Hirsch y Hunot, 2009), y se ha propuesto que exacerban la neuroinflamación (Hirsch y Hunot 2009; Hirsch et al. 2012).

Respecto a la familia de ligandos GFL, la propiedad fundamental de GDNF, neurturina y persefina es su capacidad de mantener la supervivencia de neuronas dopaminérgicas (Akerud et al. 2002; Airaksinen y Saarma 2002). Estos factores interactúan con dos tipos de receptores: GFR α , que es un receptor unido a fosfatidilinositol, y cRET, un receptor tirosina-cinasa. El GDNF actúa a diferentes niveles facilitando la recuperación tisular (Batchelor et al. 2000; Airaksinen y Saarma 2002; Salvatore et al. 2004). De este modo el GDNF recupera fibras dopaminérgicas dañadas, y facilita la arborización de neuritas (Airaksinen et al, 2002). El uso de antisentidos contra la expresión de GDNF reduce la arborización de fibras dopaminérgicas tras un daño del circuito nigroestriado (Batchelor et al, 2000). El GDNF puede regular el sistema de proteasoma-ubiquitina y disminuir la degeneración dopaminérgica (McNaught et al, 2002). El GDNF también aumenta la fosforilación de TH, dando lugar a una actividad aumentada de TH y mayor síntesis de dopamina (Salvatore et al, 2004). Los efectos sobre TH están mediados por MEK-1 y ERK (Salvatore et al, 2004). Aunque se ha postulado un déficit de GDNF en la EP, ello no se ha demostrado.

Como la detección precoz de la enfermedad neurodegenerativa es beneficiosa para el tratamiento de los pacientes, la búsqueda de marcadores diagnósticos en suero y LCR constituye un campo de investigación en continuo crecimiento (Teunissen et al. 2002). Ya que el LCR está en contacto con el espacio extracelular del cerebro, las modificaciones bioquímicas cerebrales podrían estar reflejadas en el LCR y la medida de péptidos y aminoácidos en el LCR podrían identificar biomarcadores de las enfermedades neurodegenerativas.

1.3 FACTORES ANTIOXIDANTES

El estrés oxidativo se define como una alteración del balance entre la producción de especies reactivas oxidantes y los mecanismos de defensa antioxidante (Hallwell y Gutteridge, 1999; Jenner, 2003). Puede ser causado por un exceso de especies reactivas, donde se incluyen las especies reactivas de oxígeno (ERO), especies reactivas de nitrógeno (ERN), especies halogenadas y otras; por un defecto antioxidante, o por ambas cosas (Hallwell y Gutteridge, 1999; Jenner, 2003; Fernández-Espejo, 2009; García-Moreno et al, 2013; Navarro-Yepes et al, 2014). Normalmente hay una producción basal de especies reactivas, como peróxido de hidrógeno H_2O_2 , que participan en la normal homeostasis del organismo. Se ha acuñado el nuevo término “Señalización Redox” (*Redox Signalling*) para definir este concepto (Navarro-Yepes et al, 2014). De hecho, el H_2O_2 puede actuar como mensajero intracelular a baja concentración, debido a su baja reactividad, su especificidad por residuos de cisteína y su fácil difusión (Hjalmarsson et al, 1987). El estrés oxidativo sería una “señalización Redox” exacerbada patológicamente (Figura 8).

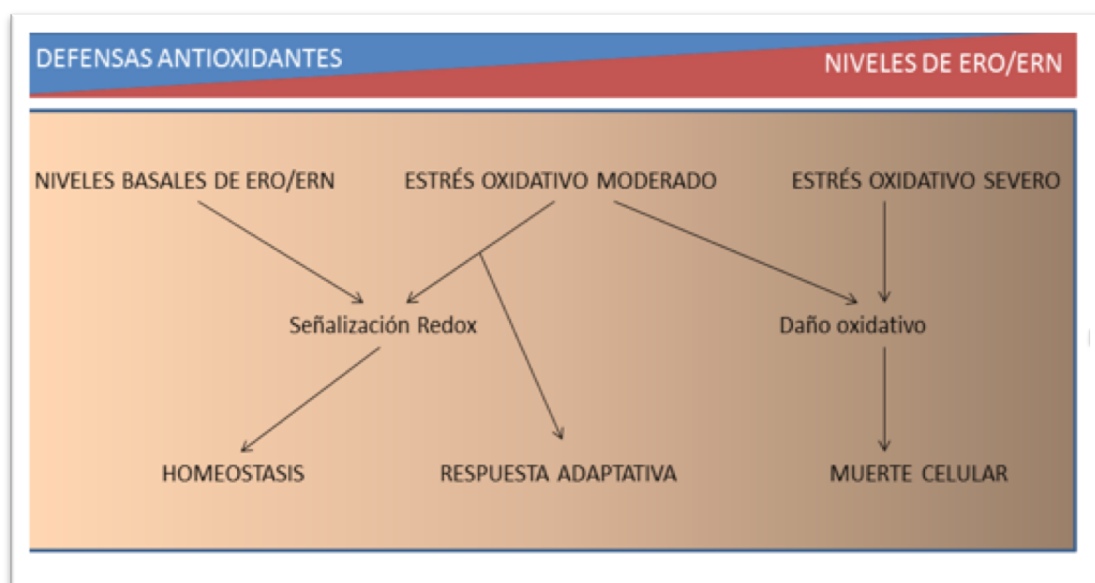


Figura 8 Homeostasis redox y estrés oxidativo. La imagen muestra la gradación desde la normal homeostasis Redox hasta el estrés oxidativo severo, propio de procesos neurodegenerativos. Un estrés oxidativo moderado con cierto daño oxidante sería propio del envejecimiento. Tomado modificado de Navarro-Yepes et al, 2014.

Diversos organelos producen ERO normalmente, como los peroxisomas (Schönfeld et al, 2009), el retículo endoplásmico (Liu et al, 2004), los lisosomas (Kubota et al, 2010), endosomas (Li et al, 2011) y el núcleo (Spencer et al, 2011). Sin embargo, las fuentes principales de ERO son la mitocondria y la membrana celular (Shapira et al, 1989; Murphy, 2009; Navarro-Yepes et al, 2014). En la mitocondria se produce ion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) en la cadena de transporte electrónico (Muller et al, 2004). En la membrana celular se localiza la oxidasa de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADHP) o enzima NOX, que también cataliza la producción de ($\bullet\text{O}_2$) desde O_2 y NADPH (Figura 9).

Ante la normal producción de especies reactivas oxidantes y con el fin de mantenerlas al nivel de “señalización Redox” homeostática, el organismo posee diversas líneas de defensa. La primera línea de defensa es minimizar la producción de ion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$). Para ello el O_2 se convierte en agua gracias a los citocromos situados en la misma cadena electrónica mitocondrial. Los iones superóxido generados son convertidos en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) gracias a las **superóxido-dismutasas (SODs)**, y luego se genera agua gracias a la reacción del H_2O_2 con el **glutati6n reducido (GSH)**, bajo el control de la enzima glutati6n peroxidasa (GPX). Hay tres isoformas de SODs en los mamíferos: manganeso SOD (mnSOD o SOD2), localizada en la mitocondria (Sutton et al, 2003); cobre-zinc SOD (CuZnSOD o SOD1) localizada en los peroxisomas, núcleo o citosol (Okado-Matsumoto y Fridovich, 2001), y la SOD extracelular (EcSOD o SOD3) anclada a la membrana celular. El sistema del glutati6n es uno de los principales sistemas enzimáticos antioxidantes, basado en la acci6n de la prote6na antioxidante glutati6n (Sian et al, 1994). El glutati6n existe en los estados reducido (GSH) y oxidado (GSSG). En el estado reducido, el grupo tiol/sulfidrilo de la ciste6na es capaz de donar un equivalente de reducci6n ($\text{H}^+ + \text{e}^-$) a mol6culas inestables, como las especies reactivas de ox6geno. Tras la donaci6n de un electr6n, el glutati6n se convierte en reactivo, y reacciona r6pidamente con otro glutati6n reactivo para formar disulfuro de glutati6n o glutati6n oxidado (GSSG). El GSH puede regenerarse a partir de GSSG gracias a la enzima **glutati6n reductasa (GR)**. El glutati6n es tambi6n cofactor de la enzima **glutati6n peroxidasa (GPX)**, que participa en la eliminaci6n del exceso de per6xido de hidrógeno como se ha comentado.

Finalmente, otra enzima del sistema, la **glutati6n-S-transferasa (GST)**, tambi6n cataliza la conjugaci6n del glutati6n reducido a diversas mol6culas oxidadas. Participa en diversas funciones antioxidantes. (Hayes et al, 2005; Josephy, 2010).

El H_2O_2 tambi6n se convierte en agua por medio de otras enzimas “limpiadoras” de agua oxigenada muy importantes: las **catalasas y las peroxirredoxinas (PRDxs)**. Las catalasas son peroxidasas localizadas en los peroxisomas y que dan lugar a reacciones de dismutaci6n. Las peroxirredoxinas (PRDxs) son peroxidasas ubicuas. Hay seis tipos de PRDxs, la PRDx1, 2 y 6 se localizan en el citoplasma, la PRDx4 en el ER, la PRDx3 en la mitocondria, y la PRDx5 en peroxisomas y mitocondrias (Hall et al, 2009). Las ciclooxigenasas (COXs) tambi6n tienen actividad peroxidasa, y en presencia de H_2O_2 son capaces de oxidar diversos sustratos como NADH y GSH, dando lugar a la producci6n de ($\bullet O_2$) (Im et al, 2006).

Otro tipo de estr6s es de origen lisos6mico, donde el exceso de ERO -- daña la membrana lisosomal o los procesos de autofagia lisosomales y se liberan productos almacenados en lisosomas, como ferritina, ceruloplasmina, hierro, cobre, y factores inflamatorios. Todo ello agrava el estr6s oxidativo. El hierro y el cobre se liberan en forma electr6nica -1 (ferrosa o Fe(II) y cuprosa o Cu(I)) que se transforman en el citosol en especies (n), f6rrica o Fe(III) o C6prica o Cu(II), altamente oxidantes. Estas especies pueden reaccionar con agua oxigenada en la reacci6n de Fenton. Esta reacci6n da lugar a especies reactivas como iones hidroxilo, y tambi6n facilitan la agregaci6n proteica, una de las caracter6sticas citol6gicas de la neurodegeneraci6n. El d6ficit de ferritina y ceruloplasmina, prote6nas “fijadoras” de metales como hierro y cobre, tambi6n contribuye al estr6s lisos6mico (Navarro-Yepes et al, 2014).

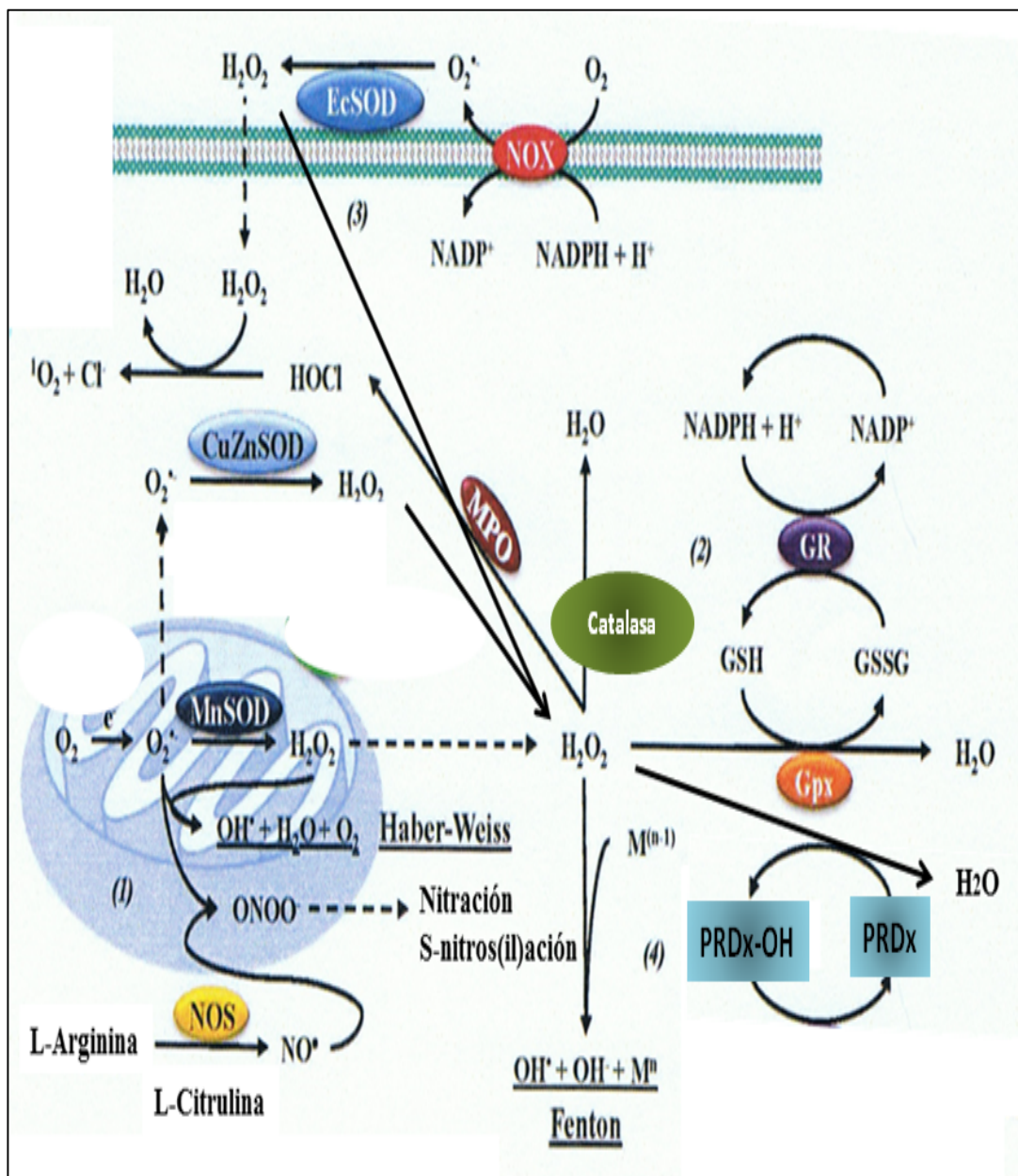


Figura 9 Vías más destacadas de estrés oxidativo. Modificado de Navarro-Yepes J et al. 2014.

Explicación de la Figura 9:

(1) La producción principal de EROs tiene lugar en la mitocondria donde el ion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) se produce en la cadena de transporte electrónico. Generalmente es convertido en agua oxigenada por la MnSOD o SOD2 mitocondrial y por la CuZnSOD o SOD1 citosólica, pero si hay exceso de ($\bullet\text{O}_2^-$) o déficit de limpieza de agua oxigenada también puede dar lugar a hidroxilos, otras especies reactivas, en la reacción de Haber-Weiss. Si además hay exceso de óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), este se une al ion superóxido dando peroxinitrito (ONOO^-), especie reactiva de nitrógeno que produce estrés nitrativo/S-nitros(il)ativo.

(2) El agua oxigenada es generalmente “limpiada” mediante conversión al agua por catalasas, por el sistema del glutatión (GPX, glutatión peroxidasa; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; GR, glutatión reductasa) y por las peroxirredoxinas (PRDx).

(3) Otra fuente importante de ERO es la oxidasa de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADHP) o enzima NOX, que cataliza la producción de $\bullet\text{O}_2^-$ desde O_2 y NADPH. El ion superóxido es convertido en agua oxigenada por la EcSOD o SOD3, y luego se forma agua por las vías descritas de peroxidasa. Si hay exceso de producción de H_2O_2 también se pueden activar haloperoxidasas como la mieloperoxidasa (MPO), dando lugar a especies halogenantes (como ácido hipocloroso o OHCl), radicales halogenantes y oxidantes.

(4) El exceso de H_2O_2 y de metales en estado ($n=0$) como Fe(III) o Cu(II) puede dar lugar a nuevos EROs por la vía de Fenton. El Fe(III) y Cu(II) suelen proceder de los lisosomas, que se dañan en el estrés oxidativo y liberan estos metales en estado electrónico($n=-1$) así como factores inflamatorios (estrés lisosómico).

1.4. ENVEJECIMIENTO NORMAL

Diversas teorías intentan explicar el proceso de envejecimiento, aunque ninguna se ha demostrado del todo válida hasta la fecha (Davidovic et al, 2010). Las teorías modernas se clasifican en dos categorías: teorías del Proceso Programado y teorías de Daño y Error.

La **Teoría del Proceso Programado** afirma que el envejecimiento sigue un curso biológico que es continuación del normal desarrollo. Hay cambios génicos “programados” que afectan a los sistemas de trofismo tisular, reparación y de defensa inmune. Esta teoría incluye varias subcategorías:

1. **Teoría del Programa:** La longevidad está programada, debido al apagado y encendido de diversos genes, dando lugar a inestabilidad génica y a la dinámica del envejecimiento.
2. **Teoría Endocrina:** El trofismo tisular se deteriora porque la edad está regulada hormonalmente, alterándose los ejes de **control trófico**, principalmente el de GH/IGF1 y el de insulina/glucagón (Van Heemst, 2010). Se sabe que con la edad hay disminución de la sensibilidad a insulina y de los niveles de GH, así como aumento de glucagón y de IGF-1 (Bauret et al, 2006).
3. **Teoría Inmunológica:** el sistema inmunológico está programado para su declive en el envejecimiento, lo que disminuye las defensas del organismo. En apoyo de esta teoría hay datos que confirman que los anticuerpos pierden eficacia con el paso del tiempo, y que el sistema inmune está desregulado en la neurodegeneración (Cornelius, 1972; Rozemuller et al, 2005).

La **Teoría del Daño y Error** se centra en el daño ambiental que origina errores acumulativos a varios niveles orgánicos. Incluye diversas subcategorías:

1. **Teoría del Desgaste:** debido al paso del tiempo, las células y los órganos pierden funcionalidades, llevando a la vejez y a la muerte. Es la teoría clásica de August Weismann de 1882.
2. **Teoría del Coste de Oxígeno:** cuanto mayor es la tasa basal de consumo de oxígeno, menor es el lapso vital (Brys et al, 2007). Actualmente se relaciona con

alteraciones causadas por el **estrés oxidativo** y a alteraciones de ejes hormonales relacionados con la resistencia al estrés metabólico, que incluyen a las hormonas tiroideas y catecolaminas, así como factores como TOR y FOXO (Hulbert et al, 2007; Rollo, 2010).

3. *Teoría de los Enlaces Cruzados*: con la edad aparecen enlaces cruzados entre las proteínas que dañan su funcionalidad y la de los tejidos. Diversos estudios apoyan este fenómeno (Bjorksten, 1968; Bjorksten y Tenhu, 1990).
4. *Teoría de los Radicales Libres*: existe un **exceso de especies reactivas debido a estrés oxidativo o descenso en la capacidad antioxidante del organismo**. La menor capacidad antioxidante se relaciona con proteínas y enzimas antioxidantes como el **sistema del glutatión, las catalasas, y las peroxidasas**. Esta teoría ya fue expuesta por Fenn y su equipo en *Science* en 1954 (Gerschman et al, 1954). Esta teoría también se relaciona con la de los enlaces cruzados.
5. *Teoría del Daño del ADN*: daños del ADN ocurren constantemente en las células, y algunos no se reparan adecuadamente por los sistemas de reparación celular y se acumulan. Estos errores aumentan con la edad y llevan al deterioro y a la disfuncionalidad. Se ha detectado que el envejecimiento se relaciona con la acumulación progresiva de productos del daño oxidante del ADN (Moller et al, 2010). Actualmente se da una mayor importancia al daño del ADN mitocondrial (Larsson, 2010), y se engarza con las teorías antes comentadas de coste de oxígeno, daño oxidativo y de enlaces cruzados.

Otros hechos se relacionan también con el envejecimiento, y deben ser integrados en las actuales teorías sobre el envejecimiento. Se sabe desde hace bastante tiempo que la restricción calórica alarga la vida de animales experimentales (McCay, 1935; Shimokawa y Trindade, 2010).

Actualmente este hecho se asocia sorprendentemente a un aumento de especies reactivas en la mitocondria por **estrés oxidativo inducido por la restricción calórica, pero que induce una regulación al alza de los sistemas antioxidantes** (glutatión, sobre todo), protegiendo a la célula (Schulz et al, 2007). Es llamativo que la dieta hipercalórica acorta la vida de los ratones, hecho que puede ser revertido con resveratrol (Bauer et al, 2004). Este hallazgo ha permitido detectar factores relacionados

con el envejecimiento, como la disminución en la sensibilidad a insulina, aumento en IGF-1, aumento del número de mitocondrias y decremento en la kinasa de AMPc (Bauer et al, 2004).

Modificaciones en los telómeros celulares también se relacionan con el envejecimiento. Se sabe que se acortan con la edad, y que ello origina que las células tengan un límite de divisiones posibles, lo que se denomina la teoría límite de Hayflick (Hayflick y Moorhead, 1961). El acortamiento telomérico parece que acorta la vida, de hecho, los espermatozoides son ricos en telomerasa, una enzima que previene dicho acortamiento (Flores et al, 2005).

Las enfermedades neurodegenerativas se asocian al envejecimiento, pues enfermedades como la enfermedad de Alzheimer (EA) o de Parkinson (EP) son más frecuentes a partir de los 65 años de edad. Desentrañar los fenómenos relacionados con la neurodegeneración ayudaría a comprender el proceso de envejecimiento. El **daño neuronal por estrés oxidativo, y déficits neurotrófico** y neurogénico se relaciona con estos hechos (Ferron et al, 2009). Se sabe que la neurogénesis cerebral se enlentece con el tiempo, por ejemplo, a nivel hipocámpico que es un locus crítico en el desarrollo de la EA (Shors et al, 2001; Jin et al, 2004; Taupin, 2010). También que hay una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas con la edad, 4-7% por década, lo que es un hecho muy relacionado con la EP (Calne y Langston, 1983).

Está ampliamente aceptado que el **envejecimiento cerebral podría estar acelerado por la acción dañina de las especies reactivas de oxígeno** (Harman 1956, Gerschman et al., 1964; Barja, 2014). El organismo posee defensas antioxidantes las cuales “barren” los radicales libres y minimizan sus efectos, pero parece que estas defensas reducen su eficacia con el envejecimiento (Jenner, 2003; García-Moreno et al, 2013; Navarro-Yepes et al, 2014). Como consecuencia , estas especies reactivas podrían participar en el desarrollo del envejecimiento celular (Barja 2014).

En el cerebro, algunas **moléculas antioxidantes se encuentran alteradas con el envejecimiento**, y su conocimiento está ayudando a desentrañar los mecanismos moleculares involucrados. Se sabe que en el envejecimiento hay reducción de potentes antioxidantes como son la melatonina, cuya secreción nocturna decrece en la vejez

(Escames et al., 2010), la coenzima Q y el ascorbato, cuyos niveles cerebrales y periféricos descienden (Spindler et al, 2009). Además, la hipoactividad de la melatonina repercute en las defensas antioxidantes y la acción trófica sobre los tejidos, pues normalmente estimula la actividad de moléculas antioxidantes como SOD, catalasas y GSH. En este contexto descensos en GSH ya han sido encontrados en el envejecimiento, aunque cambios en la actividad de SOD y catalasas no están del todo aclarados (Carrillo et al., 1992; Okabe et al., 1996). Long et al han descrito que hay un defecto del complejo I mitocondrial, que relacionan con estrés oxidativo en el envejecimiento (Long et al, 2009). Los mecanismos autofágicos de limpieza celular están deteriorados durante la vejez, pues hay daños oxidantes de proteínas que conforman los autofagosomas como la catepsina D y la proteína gliofibrilar ácida o GFAP (Grune et al, 2005).

La edad se acompaña de reducción de antioxidantes como cardiolipinas, de ascorbato y de **GSH**, tanto en hígado como cerebro (Phillipson et al, 2014). Aumentan en hígado, cerebro y diversos tejidos los **depósitos de metales como hierro y cobre**, que actúan acelerando procesos oxidantes y reacciones tipo Fenton (Double et al, 2000; Hagen et al, 2002; Anandhan et al, 2015). La edad también se acompaña de aumento de la captación tisular de glucosa, que puede originar fenómenos de glicosilación intracelulares y **dañar la mitocondria por estrés oxidativo y producción de potentes oxidantes** como sorbitol o productos de glicosilación avanzada (AGEs). Importantes enzimas antioxidantes como la hemooxigenasa-1 (HO1) y la “Heat-Shock-Protein 60” (HSP60) se ven también afectadas (Calabrese et al, 2005) durante el envejecimiento.

La proteína almacenadora de hierro Ferritina, la cual ejerce un papel de protección antioxidante reduciendo el hierro libre reactivo, podría verse afectada en el cerebro durante el envejecimiento. La Ferritina une un tercio del hierro total, de modo que un aumento de la misma reduciría el hierro libre y el estrés oxidativo asociado a metales, ejerciendo un posible papel protector (Dexter et al, 1990; Bradbury, 1997; Navarro-Yepes et al, 2014).

Existe una correlación positiva entre los niveles de ferritina en el LCR y la edad (Kuiper et al, 1994). La ferritina une un tercio del hierro total, de modo que un aumento de la misma reduciría el hierro libre y el estrés oxidativo asociado a metales, ejerciendo

un posible papel protector (Dexter et al, 1990; Bradbury, 1997; Navarro-Yepes et al, 2014).

La **Ferritina** es una importante proteína globular implicada en el almacenamiento y liberación controlada del hierro. Corresponde a un oligómero con forma de casquete hueco, que resguarda al hierro que se encuentra en su interior, y recibe el nombre de Apoferritina. A la proteína con el hierro en su interior es la que se conoce como Ferritina. Aparte de almacenar hierro en su interior, se encarga de mantener los niveles de hierro en el organismo.

Existe una estrecha relación entre el tamaño de los depósitos de hierro tisulares y la concentración de Ferritina. En el interior de la Ferritina el hierro se almacena formando un núcleo mineral inorgánico denominado ferrihidrita, en el cual los iones Fe^{3+} se encuentran coordinados con iones O^{2-} . En esta forma mineral ferrihidrita, el hierro no es soluble y para que este sea soluble debe ser reducido de Fe^{3+} a Fe^{2+} . La carga positiva del Fe^{2+} atrae la parte electronegativa de las moléculas de agua formando una envoltura alrededor del catión, así el hierro pasa a ser un complejo hidratado que puede salir de la proteína a través de los canales del casquete hueco. A través de este canal penetra dihidroxifumarato, agente reductor responsable de la transferencia de electrones para que el Fe^{3+} de la malla mineral pueda ser reducido a Fe^{2+} y viceversa.

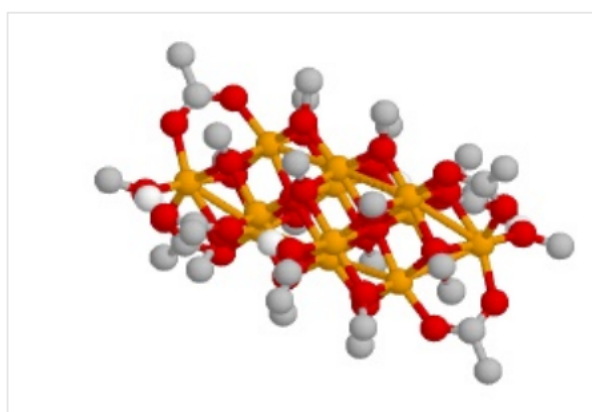


Figura 10 Estructura del núcleo mineral de hierro que se forma en el interior de la ferritina. Tomado de Ojeda R. Et al, 2010.

La respuesta inflamatoria está aumentada en el envejecimiento, sobre todo a nivel cerebral, y ello podría contribuir a su deterioro. Actualmente se ha acuñado el término **“inflammaging”**, o sea la contribución de un bajo grado de inflamación en el desarrollo del envejecimiento (Hardeland et al, 2015). A nivel cerebral, se ha detectado una **mayor activación de la microglía fagocítica**, con incremento factores proinflamatorios que pueden dañar neuronas, como interleucinas 1 β y 6 (IL-1 β , IL-6) y factor nervioso transformante alfa o TNF- α (Godbout y Johnson, 2004; Campuzano et al, 2009). Sin embargo, otros autores no han detectado dichos cambios de interleucinas, incluso en cerebro de enfermos de Alzheimer (Maggio et al, 2006). Además, el número de fagocitos decrece con la edad, aunque su morfología indica una mayor activación (aumento de ramificaciones, mayor grosor procesos celulares, más aglomerados celulares) (Pertusa et al, 2007). Otros autores han detectado también que, aunque la microglía esté más reactiva, pierde capacidad fagocítica con la edad, lo que contribuiría a una menor defensa inmune (Ritzel et al, 2015). A pesar de los datos contradictorios, se cree que el envejecimiento, sobre todo en el envejecimiento avanzado, se asocia a una reactividad aumentada de la microglía que segrega factores neuroinflamatorios en exceso, lo que constituye una respuesta exagerada a estímulos estresantes “normales” (hipotensión, leve hipoxia, estrés, trauma). Si estos estímulos estresantes (“hits”) se repiten, **la exagerada respuesta glial originaría una fuerte reactividad neuroinflamatoria que podría acelerar la aparición de enfermedades neurodegenerativas** (Lourbopoulos et al, 2015). Es la teoría del “doble hit” en la neurodegeneración, o hipótesis de “proceso e insulto” de Calne y Langston (1983) (Figura 11).

A nivel sanguíneo se ha detectado, en la población anciana, un aumento de factores relacionados con la inflamación como proteínas de fase aguda, fibrinógeno, haptoglobinas e inhibidor de la alfa proteasa. Existe una respuesta inflamatoria aumentada en las arterias de los ancianos, debida a diversos factores como inestabilidad genómica, disfunción telomérica y daño del ADN endotelial a través de la vía p53/p21.

Los mecanismos de resistencia al estrés del endotelio vascular (SIRT-1, AMPK, mTOR) se ven alterados con la edad, influyendo el **estrés oxidativo y los factores relacionados con la inflamación** (Donato et al, 2015).

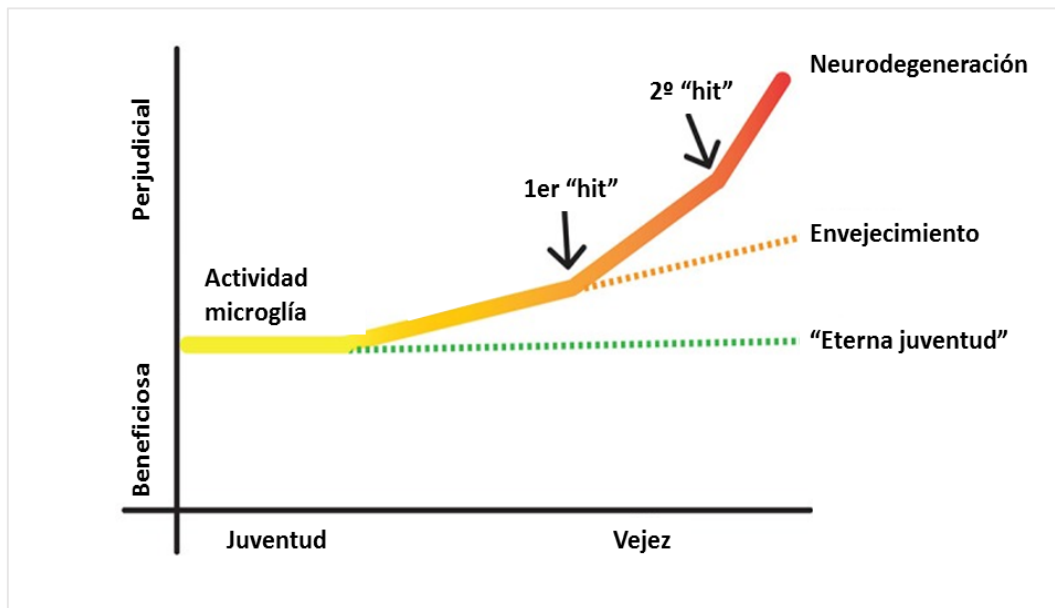


Figura 11 Microglía y envejecimiento. La figura muestra que la microglía se vuelve más reactiva con el envejecimiento normal y segrega factores neuroinflamatorios en exceso. Si se somete el cerebro a estímulos estresantes repetidos (hits), la exagerada respuesta glial podría acelerar la aparición de enfermedades neurodegenerativas. Esta teoría se relaciona con la de “proceso e insulto” de Calne y Langston 1983. Tomado de Lourdopoulos et al, 2015.

Un factor neurotrófico importante relacionado con la neuroinflamación y que se estudia en esta tesis es el BDNF. Es liberado por la microglía y, a su vez, la activa aún más en un ciclo de retroalimentación positiva (Zhang et al, 2014). Otros autores, en cambio, afirman que es un factor antiinflamatorio pues, aunque sea liberado por la microglía activada, participa en el “lenguaje cruzado” (*cross-talk*) entre astrocitos y microglía como modulador antiinflamatorio (Lai et al, 2018).

Diversos sistemas de neurotransmisión se ven “enlentecidos” con la edad, sobre todo los sistemas dopaminérgicos y colinérgicos, como se pone de manifiesto por una menor expresión cerebral del receptor D1 de dopamina, una menor actividad colinérgica, y una menor síntesis de acetilcolina (Pahapill y Lozano, 2000). Dos son los sistemas más afectados con el envejecimiento, el sistema dopaminérgico nigroestriado, y el sistema colinérgico hipocampal.

Es conocido que hay una pérdida de neuronas nigricas con la edad, a una tasa de 4-7% por década de vida (McGeer et al., 1989; Scherman et al., 1989). Esta tasa de reducción progresiva es constante, y no varía una vez que un insulto tóxico haya dañado un elevado número de células de la sustancia negra de un modo puntual, como podría ocurrir en la Enfermedad de Parkinson (Hipótesis de Calne y Langston, 1983).

En el hipocampo se sabe que la neurogénesis se enlentece con el tiempo. Este déficit neurogénico podría facilitar el desarrollo de enfermedades como la **Enfermedad de Alzheimer** (Shors et al, 2001; Jin et al, 2004; Taupin, 2010). A este nivel, la desregulación sináptica que acompaña a la edad avanzada parece estar asociada a la **pérdida de memoria**. Se postula que este hecho se debe a una respuesta neuroinflamatoria exagerada mediada por IL-1 β de origen glial.

Considerando los **factores neurotróficos** que están relacionados con las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, la supervivencia de esta población neuronal estaría dependiendo críticamente de estos “factores dopaminotróficos”, como son los Ligandos de la Familia relacionada con la línea de las células Gliales GFL y el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro **BDNF**. La familia GFL incluye el Factor Neurotrófico Derivado de la línea Glial **GDNF**, Neurontina **NRTN** y Persefina **PSPN** (Lin et al., 1993; Kriegstein et al., 1998; Rosenblad et al., 1999; Airaksinen and Saarma, 2002; Fjord-Larsen et al., 2005).

BDNF es importante para el desarrollo y supervivencia de las neuronas de la sustancia negra dopaminérgica (Mogi et al., 1999). BDNF además de su función dopaminérgica, es importante para el mantenimiento de otras poblaciones de neuronas que median procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria (Korhonen et al., 1998; Albrecht et al., 2006).

La inflamación cerebral podría estar exacerbada, al menos en parte, por factores tróficos de la familia de Factores Transformadores del Crecimiento TFG Family como son el **TGFB₁** y **TGFB₂**. Estos ligandos están relacionados con la actividad de la microglía y son considerados como factores proinflamatorios (Unsicker et al., 1991; Wys _Coray et al., 2001; Hirsch and Hunot, 2009; Hischet al., 2012).

Además, el BDNF está también relacionado con la neuroinflamación. Este factor puede estar liberado por la microglía activada y esta liberación de BDNF activa la microglía en un ciclo de retroalimentación positiva (Zhang et al., 2014). Por tanto, BDNF actúa como una citosina proinflamatoria (Zhang et al., 2014). En consecuencia, BDNF parece ser un doble compuesto: exceso de BDNF es proinflamatorio, pero el déficit de BDNF reduce su eficacia neurotrófica. Sin embargo, este papel del BDNF en la neuroinflamación ha sido cuestionado, porque recientemente algunos autores han atribuido efectos antiinflamatorios a niveles excesivos de BDNF. Afirman que es un factor antiinflamatorio pues, aunque sea liberado por la microglía activada, participa en el “lenguaje cruzado” (*cross talk*) entre astrocitos y microglía como modulador antiinflamatorio (Lai et al., 2018)

Este factor neurotrófico protege a las neuronas del daño causado por infecciones o traumas, y facilita la plasticidad sináptica hipocámpica (Patterson, 2014; Petzold et al, 2015). De este modo la plasticidad sináptica necesaria para la **memoria** se vería afectada con el envejecimiento (Patterson, 2014). Sin embargo, hay que añadir que otros autores afirman que no hay cambios reactivos en BDNF con el envejecimiento, y que ello no se asocia a cambios amnésicos en los sujetos (Mogi et al, 1999). Debido a datos contradictorios, el factor BDNF es uno de los analizados en esta tesis doctoral a nivel del líquido cefalorraquídeo.

1.5. DETERIORO COGNITIVO LEVE

Deterioro Cognitivo es la disminución mantenida del rendimiento de las funciones intelectuales o cognitivas desde un nivel previo más elevado. El Deterioro Cognitivo Leve (DCL) es conceptualizado como una frontera entre el Envejecimiento Normal y la Demencia, y agrupa a pacientes con un declinar cognitivo cuya cuantía sobrepasa el Envejecimiento Normal, aunque no es suficientemente severo para diagnosticar una Demencia.

En principio solo se consideraron como candidatos a diagnóstico de DCL los trastornos de memoria (basados en las quejas subjetivas del paciente y objetivado en puntuaciones inferiores a la normalidad en los tests de memoria), con un funcionamiento normal en el resto de las funciones cognitivas. Sin embargo, la evaluación de funciones cognitivas es más amplia que solo la memoria, e incluye la atención, lenguaje, funciones ejecutivas, gnosias, praxias, habilidades visoespaciales y velocidad de procesamiento que pueden alterarse en un DCL (Wilson et al, 2011). Actualmente, cuando se hace un diagnóstico de DCL, suele indicarse el subtipo en función de si se presentan alteradas o no otras funciones cognitivas, por ejemplo “DCL de tipo amnésico”, “DCL multidominio con alteración de la memoria y funciones ejecutivas”, etc.

La prevalencia de DCL en sujetos mayores de 65 años oscila entre 17 y 34% (Morris et al, 2001). Según diversos estudios alrededor del 15% de los sujetos con DCL evolucionan cada año a Demencia (Petersen et al., 2009) . Actualmente, dado este alto porcentaje anual de evolución a Demencia, y sobre todo a Enfermedad de Alzheimer (EA), numerosos estudios focalizan en el DCL como un estadio previo a esta enfermedad. Los nuevos criterios de diagnóstico del DCL incluyen biomarcadores, pero, en la práctica diaria, la historia clínica y la evaluación de diversas esferas, sobre todo la neuropsicológica, siguen siendo las herramientas más eficaces.

Entre los biomarcadores especialmente útiles en investigación podemos destacar:

- Incremento del amiloide cerebral estudiado mediante tomografía por emisión de positrones (PET) y disminución del amiloide en LCR.

- Elevación en LCR de la proteína Tau o de Fosfo-Tau o cociente elevado de Tau/Fosfo Tau
- Disminución del grosor o atrofia del hipocampo visto en RMN.

La evaluación del deterioro en la consulta diaria debe fundamentarse en una historia clínica detallada valorando los cambios cognitivos y funcionales que hayan tenido lugar en los últimos meses o años, la información de los familiares, la evaluación neuropsicológica, funcional y neuropsiquiátrica y, por último, la exploración neurológica y las pruebas complementarias recomendadas (Claver, 2008). Los objetivos que se persigue son:

1. Detectar el deterioro cognitivo y el grado de ese deterioro. Esto nos lleva a diferenciar el DCL del Envejecimiento Normal y de la Demencia.
2. Detectar las áreas cognitivas alteradas y las conservadas.
3. Facilitar el seguimiento de las personas con DCL y su posible evolución a Demencia.
4. Favorecer la intervención, mediante la estimulación cognitiva y otros medios, y comprobar su beneficio.

El proceso de evaluación comienza atendiendo a la demanda del sujeto, principalmente sobre quejas de memoria, para proceder después a unas pruebas de detección o cribaje. Si estas pruebas de detección indican probable deterioro se emplearán baterías o test específicos para evaluar las áreas cognitivas, así como la evaluación de alteraciones funcionales como las actividades de la vida diaria.

Las pruebas de detección o Screening evalúan principalmente el rendimiento cognitivo global o un dominio sospechoso de alterarse con frecuencia en el DCL. La mas utilizada es el **Mini Mental State Examination (MMSE)** (Folstein et al, 1975; Lobo et al, 1979; Manubens et al, 1998). Su rango es de 0 a 30 puntos, siendo su punto de corte para probable deterioro cognitivo de 23/24. Valora la orientación espacial, temporal, memoria inmediatas, recuerdo diferido, atención, praxias, ordenes y lenguaje. Está influenciada por el nivel educativo pero tiene puntos de corrección para personas analfabetas. En España, se ha empleado la versión española del MMSE de 35 puntos con el mismo punto de corte. El MMSE tiene diversas criticas, però es mundialmente

utilizado por lo que constituye una prueba de referencia para la valoración y para la comunicación entre investigadores y clínicos.

Para confirmar la sospecha se completa la evaluación por áreas, sobre todo la memoria, o empleando baterías especiales para deterioro cognitivo y/o demencia. El National Institute on Aging and the Alzheimer's Association (Albert et al, 2011) coincide en la dificultad de diferenciar entre normalidad y DCL y para ello recomienda emplear como criterio que las pruebas cognitivas se sitúen una o una y media desviación típica por debajo de la media de edad y nivel cultural, aunque se trata de una orientación y no de un punto de corte. Para ello es muy conveniente realizar una evaluación más específica por áreas cognitivas sospechosas de estar alteradas y evaluar si la alteración se mantiene en el tiempo.

La memoria es la función cognitiva que se altera de forma más temprana. Algunos de los test de memoria recomendados son listas de palabras como el **Test de Aprendizaje Verbal de Rey (Rey Auditory Learning Test o RAVLT, versión en español)**, que es muy sensible para detectar sujetos con DCL a través de la respuesta verbal (Ryan y Geisser, 1986; Estéves-González et al, 2003) y la Lista de palabras de Wechsler Memory Scale III (WMS III) (Wechsler, 2004) en la que se presentan 12 palabras y se pide un recuerdo y reconocimiento demorado.

Una condición para el diagnóstico de Demencia es que haya alteración en las actividades de la vida diaria (aspecto social, laboral-ocupacional o de las actividades habituales que antes realizaba) de manera que el paciente sea “dependiente” de otras personas. Estas alteraciones de la vida diaria son fundamentales en el momento de diferenciar el DCL de la Demencia y suelen utilizarse como un criterio mayor de diferenciación. En el DCL se supone que estas alteraciones no existen o son mínimas.

Hay varios tipos de actividades de la vida diaria (AVD). entre ella encontramos las AVD “Básicas” (bañarse, comer, asearse, ir al baño, vestirse, moverse). Sin embargo, para diferenciar entre DCL y Demencia interesa valorar las llamadas “Actividades Instrumentales”: poder hablar por teléfono, lavarse la ropa, prepararse la comida, cuidar sus asuntos económicos, poder coger transportes, tomar la medicación, ir de compras o cuidar la casa. Hay diversos instrumentos que valora estas actividades. Entre ellos se encuentran la **Escala de Lawton-Brody** (Lawton y Brody 1969) que valora las ocho

actividades anteriores o el Cuestionario de Actividad Funcional de Pfeffer (Pfeffer et al., 1982) que añade otras actividades tales como saludar a personas conocidas, estar al corriente de las noticias del entorno, recordar citas o días especiales como cumpleaños, etc.

La escala de Lawton-Brody tiene dos modos de puntuar cada ítem: una de forma dicotómica y otra en una escala de 0 a 4. En nuestro país se ha estudiado la validez clínica de las Escalas de Lawton-Brody y de Pfeffer con los siguientes resultados (Olazaran et al., 2005; Montejo-Carrasco et al., 2012): la Escala de Lawton con puntuación dicotómica tiene un punto de corte de 7/8, y en la puntuación escalar (rango de 0-25) el punto de corte es 19/20. La escala de Pfeffer tiene un rango de 0-33 de manera que una mayor puntuación indica mayor incapacidad funcional; el punto de corte para Demencia es de 6/7, lo que indica que puede haber DCL con alteraciones en las actividades de la vida diaria, pero estas alteraciones deben ser pocas y/o leves.

La importancia de la valoración de la AVD es grande; por ejemplo, un estudio demostró que algunas actividades de la Escala de Lawton-Brody como el uso de teléfono, la toma de medicación, el uso de transporte y el manejo de la propia economía son productoras de desarrollo de demencia un año mas tarde; además, la Odds Ratio subía desde 10,6 cuando era dependiente de una actividad , a 318,4 cuando era dependiente de las cuatro actividades (Barberger-Gateau et al., 1993).

Una de las causas mas frecuentes de deterioro cognitivo son los trastornos psiquiátricos. Las enfermedades que con mas frecuencia los originan son la depresión, el trastorno bipolar o psicosis maniaco depresiva y la esquizofrenia. De entre todas ellas, la de mayor prevalencia es la depresión, por lo que numerosos protocolos e investigaciones sobre deterioro cognitivo buscan descartar depresión como posible origen de dicho deterioro.

Además de la correcta evaluación clínica del sujeto con probable DCL, que es imprescindible según los actuales criterios, se pueden utilizar determinadas pruebas complementarias. No existe un protocolo de estudio definido para realizar en los casos de DCL, sin embargo por extrapolación de las Demencias podría valorarse las pruebas de imagen cerebral (RMN fundamentalmente) y los estudios bioquímicos. Otros estudios como **análisis del LCR**, determinaciones genéticas (como la ApoE) o los estudios

con PET se suelen utilizar por el momento, en el contexto de estudios o investigaciones clínicas.

Los pacientes con Deterioro Cognitivo Leve que tienen una reducción de los niveles de proteína $A\beta_{42}$ en LCR evolucionan rápidamente a Demencia, mientras que los que tienen niveles más altos permanecen estables más tiempo (Monge-Argilés et al, 2012).

En el momento actual, con los nuevos criterios diagnósticos, esta cobrando cada vez mayor importancia el DCL que es considerado por muchos autores la fase prodrómica de la EA. Es necesario realizar el diagnóstico de estas personas y hacerlo sobre todo de forma precoz pues entonces se pueden evitar o disminuir riesgos, comenzar un tratamiento temprano, informar a la familia del modo adecuado para buscar su colaboración, adaptar aspectos de la vida y vivienda del paciente, evitar complicaciones económicas, retrasar la evolución de la demencia y la institucionalización, etc.

Con la identificación de los casos de DCL se puede realizar una intervención cognitiva que enlentezca o retrase el proceso de deterioro y seguir su evolución en el tiempo dada su gran probabilidad de progresar a demencia. Un reto de las distintas unidades de especializadas en esta evaluación es aportar datos normativos y puntos de corte de las pruebas de evaluación con el fin de facilitar la diferenciación entre la normalidad y el DCL:

1.6. ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson (EP) es una de los desórdenes neurodegenerativos más frecuente, afectando a casi un **1% de la población mayor de 65 años**, lo que supone que en España hay afectados más de 110.000 personas. Comienza de forma insidiosa y progresa lentamente, a ritmo variable, durante 10-20 años o más antes de culminar en invalidez grave y muerte. Fue descrita originalmente por James Parkinson en 1817: “movimiento trémulo involuntario, con debilidad muscular, en parte sin estar en acción o incluso afectando el normal apoyo, con tendencia al encorvamiento hacia delante y a acelerar el paso sin motivo; estando los sentidos y el intelecto intactos”.

Aunque la causa de la EP idiopática es desconocida, varias hipótesis son tenidas en cuenta. La alteración en los **factores neurotróficos que mantienen las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra**, el **déficit de defensas antioxidantes en el SNC** y el **déficit de ferritina** se han asociado a la EP.

Su sintomatología motora se debe principalmente a la fuerte pérdida de neuronas de dopamina localizadas en la sustancia negra, que proyecta a los ganglios basales, mediante una vía de proyección que se denomina vía nigroestriada, y que participa en la normal modulación del movimiento. La disfunción de esta vía por falta de dopamina origina trastornos motores serios, como temblor en reposo, acinesia, dificultad para caminar, alteración del normal equilibrio, amimia (falta de expresión facial), etc. Las imágenes de tomografía de emisión de positrones (PET) de personas con EP utilizando marcadores dopaminérgicos radioactivos (¹⁵Ffluorodopa) muestran claramente la hipoactividad dopaminérgica en los ganglios basales, y se emplean para el diagnóstico de la enfermedad.

El hecho neuropatológico fundamental de la EP es la presencia de los llamados cuerpos de Lewy en la sustancia negra, así como una fuerte pérdida de neuronas de dopamina en esta estructura (mayor del 50% cuando aparece la sintomatología motora). Los cuerpos de Lewy, descritos por este autor en 1912, son inclusiones de 5 a 25 micras de diámetro, con un núcleo denso eosinofílico rodeado por un halo pálido (Figura 12).

En el núcleo denso se detectan depósitos de proteínas como ubiquitinas, α -sinucleína (α SYN) y microfilamentos. Los cuerpos de Lewy se detectan en otros lugares

del sistema nervioso, como los plexos intestinales, el bulbo olfatorio, centros mesencefálicos, y glándulas salivares, lo que sugiere la presencia de una enfermedad neurodegenerativa sistémica. Este hecho ha permitido enumerar una teoría patogénica sobre la EP que afirma que es de origen periférico y que podría relacionarse con un patógeno “invasor”. Se sabe que en la EP existe una afectación del sistema nervioso autónomo en las neuronas simpáticas posganglionares de varios órganos, y de forma característica del corazón en el que tiene lugar una denervación simpática posganglionar que ya está presente desde fases presintomáticas de la enfermedad. Las alteraciones vegetativas que estos pacientes presentan se podrían explicar por la existencia de cuerpos de Lewy en los núcleos vagales bulbares, en los ganglios raquídeos simpáticos del plexo cardíaco (Iwanaga et al., 1999), y en el sistema nervioso entérico con alteración en el tránsito intestinal, control vesical, rectal o disfunción eréctil (Wakabayashi et al, 1990; Poewe, 2002).

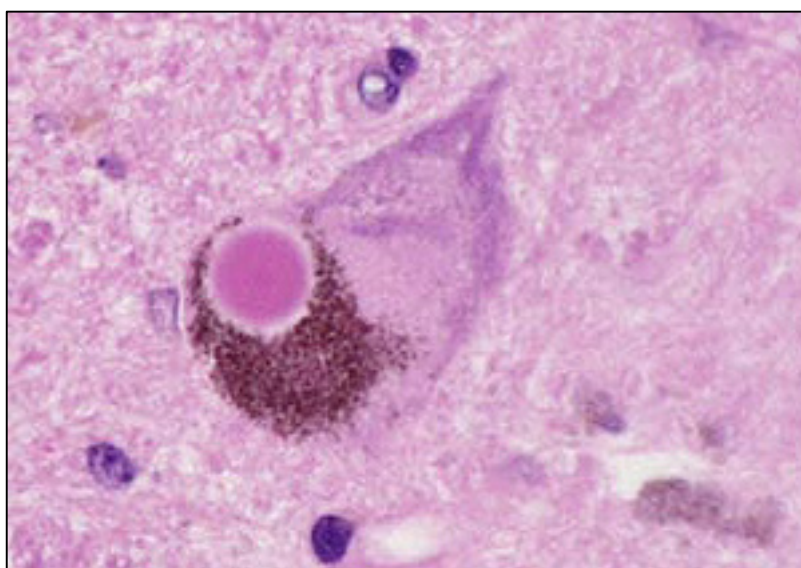


Figura 12 Cuerpo de Lewy. Neurona de sustancia negra con inclusión o cuerpo de Lewy característico, con halo claro y centro más oscuro eosinofílico. Se observan abundantes depósitos de neuromelanina en el citosol. Tomado *deflatebelly.com*.

Se acepta ampliamente que hay un factor genético importante, pues estudios con gemelos han detectado que hay una alta concordancia entre gemelos monocigotos (55%) que es tres veces superior a la de mellizos (dicigotos, 18%). Sin embargo, esta

concordancia solo se observa en gemelos cuando el comienzo de la enfermedad es anterior a los 50 años, lo que indica que hay factores ambientales decisivos en la patogénesis de la EP.

La mayoría de los casos son esporádicos, y los casos familiares son raros (se estima que la incidencia familiar es del 1 al 2 por ciento). Cuanto más temprana es la edad de comienzo, más alta es la probabilidad de que el factor genético juegue un papel dominante. Un estudio reveló que el riesgo en los hermanos de un enfermo varía con la edad de comienzo de la enfermedad (Martin et al, 1973). Así el riesgo es 1: 12 si dicha edad es menor que 45, de 1: 20 si está entre 45 y 55 años, de 1: 26 entre 55 y 65 años, y de 1: 71 si es superior a 65 años.

Varios genes se han vinculado a la patogénesis de las EP. El primero que fue clonado fue identificado en una familia Italoamericana en 1990, y se sitúa en el cromosoma 4, en la región q21-q23. Este locus génico se designó *PARK1*, representa un gen que codifica la proteína α SYN. Otra mutación se localizó en pacientes japoneses, en el cromosoma 6, región q. En estos casos la edad de comienzo era muy temprana y el gen alterado codifica la proteína parkina (gen *PARK2*), que es una ubiquitina, implicando al complejo ubiquitina-proteasoma en la EP. Este complejo llamado UPS es una maquinaria que posee la célula para eliminar proteínas anómalas o dañadas, por lo que parece ser un hecho importante en la patogénesis de la EP es la acumulación intraneuronal de proteínas anómalas que no son degradadas adecuadamente por el UPS. Hasta la fecha se han involucrado 18 genes de modo directo con la EP (*PARK1-18*).

En ausencia de una causa genética, las influencias ambientales parece que juegan un papel determinante. Una de las hipótesis es la acción de una toxina ambiental. La vida agrícola rural se ha asociado con mayor riesgo de sufrir EP. La actividad agrícola facilita el contacto con pesticidas, entre los cuales la dieldrina o los ditiocarbamatos se han asociado a un mayor riesgo de EP. La pesticida rotenona puede causar parkinsonismo en animales de laboratorio.

Otro tóxico ambiental podría ser la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), un contaminante de la heroína. Langston y colaboradores mostraron que la MPTP causaba un síndrome parkinsoniano en drogadictos que se lo inyectaron de modo

inadvertido (Langston et al, 1983). La MPTP se convierte en el cerebro en su metabolito MPP⁺ que es la verdadera neurotoxina, pues es captada por las neuronas de dopamina de modo selectivo y origina su destrucción por formación de radicales libres con fuerte poder oxidante. La MPTP puede producir un cuadro parkinsoniano en 7-14 días y se emplea con frecuencia en los laboratorios para inducir cuadros de parkinsonismo en animales de investigación. Sin embargo, su presencia ambiental en la génesis de la EP esporádica no se ha demostrado hasta la fecha. Es importante destacar que los pesticidas y el MPP⁺ son inhibidores mitocondriales, un orgánulo de la célula fundamental en el metabolismo energético, y que en los enfermos de Parkinson se ha detectado una **deficiencia del complejo I mitocondrial en la sustancia negra**. Si alguna toxina ambiental induce la EP, podría actuar a ese nivel.

Otra teoría es la existencia de un patógeno ambiental de tipo bacteriano o vírico que dañaría el sistema nervioso poniendo en marcha procesos oxidantes. Esta hipótesis ha dado lugar a la teoría del “efecto dominó” con destrucción progresiva de centros nerviosos. La mayor o menor presencia de cuerpos de Lewy en determinados centros cerebrales ha sido estudiada por diversos grupos de investigación, destacando los estudios de Braak y colaboradores (Braak et al. 2002, 2003). Estos autores proponen una hipótesis patogénica de la EP, donde estaría involucrado un patógeno desconocido que va afectando centros nerviosos de un modo ordenado y predecible. Afirman que el proceso patológico va afectando a algunos tipos neuronales de los plexos nerviosos del intestino, sistema nervioso periférico y sistema nervioso central, durante años. El factor común es que se afectan centros conectados entre sí por fibras nerviosas no mielínicas (la mielina es una barrera protectora de fibras nerviosas a modo de cubierta de un cable eléctrico). La formación de los cuerpos de Lewy sería debida a la acción oxidativa del patógeno o a la alteración de proteínas como la α -sinucleína y ubiquitinas. El patógeno podría ser una bacteria o un virus neurotrópico (con afinidad por el tejido nervioso) o incluso un prión (proteínas anómalas patógenas).

El proceso neurodegenerativo se dividiría en seis estadios evolutivos (Figura 12). Los cambios más tempranos tienen lugar en el núcleo motor del nervio vago y en el bulbo olfatorio. Es de destacar que el nervio vago envía fibras amielínicas a todo el tubo digestivo, donde hace sinapsis con los plexos nerviosos intestinales. En estos plexos

también se detecta la presencia de cuerpos de Lewy y se propone que el proceso patogénico comenzaría ahí, por medio de algún patógeno que “accede” al sistema nervioso a través del intestino. La entrada por el bulbo olfatorio no es descartable, quizás por acción de patógenos o toxinas ambientales. Este estadio inicial o “premotor” sería asintomático y actualmente no diagnosticable. En realidad, se acompaña de signos como estreñimiento, hiposmia, alteración del sueño REM o hipotensión ortostática, que no conducen al médico pero que son referidos por el paciente a posteriori. El estudio de esta fase “premotora” cobra mayor importancia actualmente.

En el segundo estadio se afectan centros cercanos al núcleo del vago y conectados con él mediante fibras amielínicas, como son el núcleo del rafe, la formación reticular y el *locus coeruleus* (los llamados centros de ganancia del tronco del encéfalo). Es de destacar que centros conectados con el núcleo del vago por medio de fibras mielínicas, como el núcleo del tracto solitario o el núcleo ambiguo, no se ven afectados.

En el estadio 3 la patología ya afecta al mesencéfalo y se hace evidente la sintomatología de la EP. La destrucción neuronal masiva se desarrolla ahora principalmente en la sustancia negra, núcleo del septo, amígdala central y núcleo basal de Meynert. La sustancia negra se conecta con la amígdala dentro de esta red, de modo que el patógeno podría acceder a la misma por vía de la amígdala. En este estadio la sintomatología ya se haría evidente en forma de alteraciones motoras debidas a la muerte neuronal en la sustancia negra, y disfunciones emocionales por afectación de la amígdala.

En el estadio 4, el proceso patológico ya penetraría en centros superiores encefálicos afectando a la corteza cerebral. Por ejemplo, la amígdala recibe una fuerte inervación desde la corteza temporal y el patógeno podría acceder a la corteza por esta vía.

Luego, como si fuera un efecto de fichas de dominó que caen, se van afectando otras zonas de la corteza. En este estadio ya hay afectación de funciones superiores, como memoria, autocrítica, aprendizaje, etc., que como se sabe se alteran en los últimos estadios de la EP.

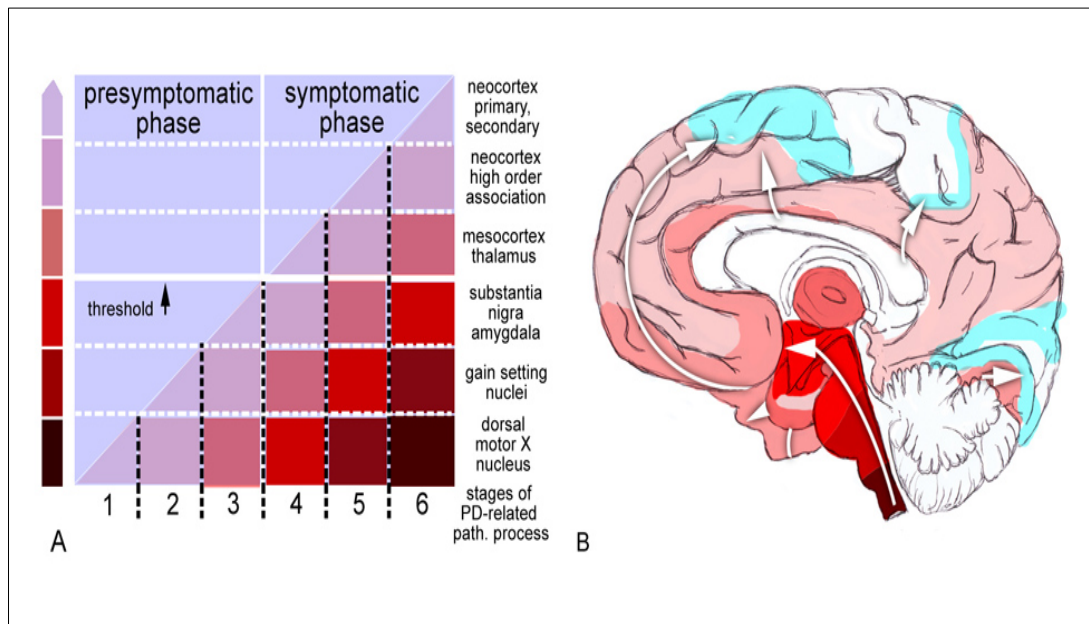


Figura 13 Etapas de desarrollo de cuerpos de Lewy según Braak y su equipo.
Tomado de Braak et al. J Neurol. 2002; 249 Suppl 3: III/1-5.

De acuerdo a los criterios de Braak y su equipo, actualmente se considera que existe una fase premotora y otra motora. La fase premotora comenzaría unos 4-5 años antes de los síntomas motores, que son los referidos por el paciente ante su médico y el motivo usual de consulta (Fearnley y Lees, 1991; Morrish et al., 1996; Schwarz et al, 2004). La fase premotora se define por un rango de síntomas ya comentados como desorden del sueño REM, hipo/anosmia, y disfunción autonómica incluyendo estreñimiento y pérdida de reflejos cardíacos. Como se ha comentado, los síntomas motores aparecen cuando el daño nítico es superior al 50%, lo que confirma la existencia de un proceso insidioso previo.

Se ha comprobado recientemente que el estudio de la función olfatoria para detectar la hipo/anosmia ayuda a predecir la aparición de la EP en sujetos que además sufran de “Alteración Conductual del Sueño REM” (“REM sleep behavior disorder” o RBD) (Mahlknecht et al, 2015). Otros estudios indican que puede haber patología con cuerpos de Lewy en tejidos periféricos, como el plexo mientérico o el corazón, sin la presencia de sintomatología alguna (Wolters y Braak, 2006; Bloch et al., 2006; Gelpi et al, 2014). Finalmente, diversos autores afirman que, si el descenso de actividad

dopaminérgica fuera menor de lo calculado según los estudios de neuroimagen, existiría también una fase preclínica (Schwarz et al, 2004). Esta fase no presentaría sintomatología, pero la patología de la EP ya estaría presente (Stern et al., 2005).

La **EP es una enfermedad claramente ligada al envejecimiento**, y su **prevalencia es mayor en personas mayores de 60 años** (Bennett et al, 1996; Morens et al, 1996; Tanner y Goldman, 1996). Zhang y su equipo (2005) realizó un estudio en la población rural de Linxian (China), y encontraron una prevalencia de 103 casos/100.000 habitantes en la franja de edad de los 50 a los 59; pero esta prevalencia aumentó 6 veces (621/100.000) en la franja de edad de los 60 a los 69 años; y 9 veces (902/1000 entre los 70 y 79 años. Como se ha comentado, ambos son la consecuencia de la acción persistente y simultánea de agentes neurotóxicos y factores genéticos (Olson, 1987; Olanow y Tatton, 1999). Entre dichos fenómenos neurotóxicos destacan el **estrés oxidativo, la neuroinflamación, el déficit neurotrófico** y la formación de agregados proteináceos de proteínas oxidadas como la α SYN.

Calne y Langston (1983) propusieron que una combinación de un insulto o insultos ambientales añadidos al **Envejecimiento Normal** podría conducir a la degeneración de las neuronas monoaminérgicas en la EP. Es la hipótesis de *proceso e insulto*. Proponen que existe una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas con la edad, 4-7% por década, “sobre” la que insultos estresantes pueden producir una muerte aguda que podría originar el desarrollo de la EP. Se ha comentado que “hits” sobre la microglía reactiva pueden jugar un papel decisivo en ello (Lourbopoulos et al, 2015).

Un estudio desarrollado por McGeer *et al.* (1977) demostró que de 400.000 neuronas que había en la SN al nacer, a la edad de 60 años solo quedaban 250.000. Además de la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SN, también se produce una pérdida paralela de DA en el estriado con la edad, como demostraron Carlsson y Winbland (1976), quienes encontraron una reducción lineal de DA en el caudado y el putamen de sujetos sanos fallecidos entre los 28 y los 91 años. Esta **pérdida de neuronas catecolaminérgicas con la edad en los sujetos con envejecimiento normal**, sugiere la posibilidad (“hipótesis de la toxina endógena”) de que algún proceso metabólico propio

de estas células es el responsable de su propia destrucción. También abre la posibilidad de que haya un **déficit progresivo de factores tróficos del sistema dopaminérgico con la edad, como GDNF o TGFβ**.

Algunas observaciones sobre la historia natural de la EP apoyarían la hipótesis de proceso e insulto (Stark y Pakkenberg 2004). Así, la bradicinesia, más que la rigidez, se correlaciona fuertemente de forma lineal con el déficit de DA medido mediante PET con ^{18}F -fluorodopa en pacientes no tratados. A su vez, la captación estriatal de ^{18}F -fluorodopa se correlaciona con el número de neuronas nigricas supervivientes en estudios post-mortem. Por tanto, la progresión de las puntuaciones de la bradicinesia en pacientes sin tratamiento, se correlaciona linealmente con el número de neuronas dopaminérgicas en la SN en la EP y, en consecuencia, con la progresión de la patología subyacente en la enfermedad. Por otro lado, Lee *et al.* (1994) afirman que la patología de la EP tiene una progresión más rápida en la fase temprana de la misma. De esta manera, hoy es generalmente aceptado que la patogénesis de la EP implica tanto un *evento* como un *proceso lineal progresivo*. Esto es, que a la pérdida progresiva y lineal de neuronas en la SN debido al envejecimiento se suma un evento inicial y a un proceso continuo. Ello explicaría, por qué la EP progresa más rápidamente en las personas mayores cuya reserva nigrica dopaminérgica es menor (Star y Pakkenberg, 2004).

Existen semejanzas entre la neurodegeneración de la sustancia negra en la EP y en el envejecimiento. Las neuronas que más degeneran en ambos casos son las células de la sustancia negra pars compacta (SNpc) que expresan marcadores dopaminérgicos (tirosina hidroxilasa o TH, monoaminoxidasa o MAO, transportador de dopamina o DAT). En la EP presentan un déficit de expresión de neuromelanina y agregados proteínicos o cuerpos de Lewy que expresan proteínas como αSYN y ubiquitinas, entre otras. El envejecimiento no se acompaña de una fuerte presencia de cuerpos de Lewy en las neuronas de SNpc, aunque sí se ha descrito su presencia en dichas neuronas y otras (Li *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2005). Sin embargo, sí hay numerosas inclusiones positivas a ubiquitina o cuerpos de Marinesco (Beach *et al.*, 2004; Yuen y Baxter, 1963), que también se detectan en la EP (Beach *et al.*, 2004) (Figura 14).

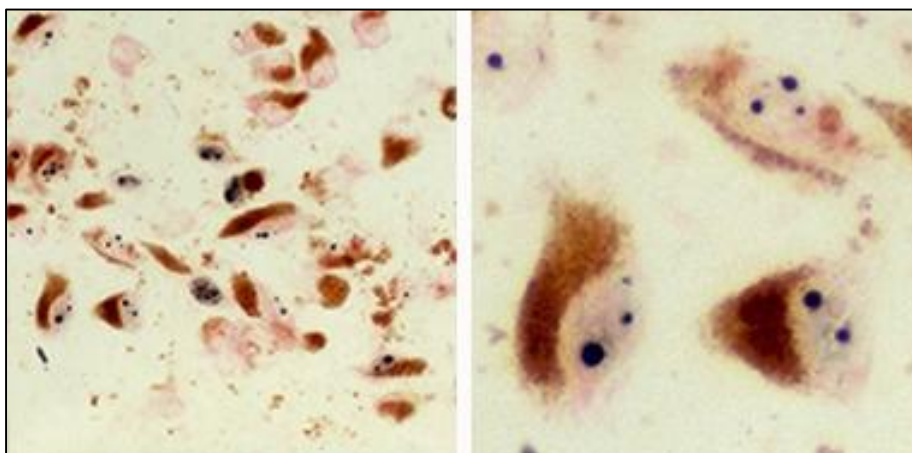


Figura 14 Cuerpos de Marinesco. Los cuerpos de Marinesco (inclusiones negras) en neuronas de sustancia negra que expresan tirosina-hidroxilasa (señal marrón). Su presencia se detecta tanto en el envejecimiento como en la EP. Tomado de Beach et al, 2004.

El déficit neurotrófico asociado al envejecimiento también se detecta en la EP. Hay hipofunción astrocítica que reduce la liberación de agentes neuroprotectores como **GDNF** y FGFb (Saavedra et al, 2006). También hay descenso en el número de astrocitos, lo que reduce la limpieza de moléculas tóxicas, por ejemplo, las formas fosforiladas y nitradas de proteínas como la α SYN y la parkina. Al igual que en el envejecimiento, la microglía está activada en la EP, aún más por la mayor presencia de agregados proteináceos anormales. Hay un incremento de marcadores proinflamatorios macrofágicos como interleucina-1 β , interleucina-6 y TNF- α que pueden dañar las neuronas (Hunot et al, 1996; Croisier et al, 2005). Finalmente, hay mayor número de errores o mutaciones somáticas en el ADN mitocondrial de neuronas de DA de la EP, al igual que sucede en el envejecimiento (Lin et al, 2012).

La muerte neuronal en la enfermedad de Parkinson parece ser debida a **procesos oxidantes**. Los procesos de muerte neuronal oxidativa se conocen con más detalle en la sustancia negra, donde se han estudiado más intensamente.

Las neuronas nígricas dopaminérgicas están expuestas a un ambiente muy oxidante porque el metabolismo de la dopamina genera dopamina-quinonas, radicales superóxidos y peróxido de hidrógeno, todas moléculas oxidantes. El peróxido de hidrógeno es generalmente inocuo, pero puede dar lugar a radicales hidroxilos

citotóxicos, en una reacción catalizada por hierro (reacción de Fenton). Esta reacción puede ser significativa si **se reducen los niveles de GSH y hay exceso de hierro en forma Fe(III) o de cobre en forma Cu(II), como parece suceder en la EP** (Double et al, 2000; Sian-Hulsmann et al, 2011). La forma Fe(III) y su depósito están además facilitados en la EP por el **déficit de ferritina** y ceruloplasmina (que es una ferroxidasa que oxida el hierro ferroso) (Dexter et al, 1990; Kuiper et al, 1994, Olivieri et al, 2011). El radical superóxido tampoco es peligroso generalmente, pero si se incrementan los niveles de óxido nítrico (NO) en la célula, como parece ser también el caso en la EP, reacciona con el NO formando peroxinitritos y radicales hidroxilos, agentes fuertemente oxidantes. Además, el NO puede desplazar hierro desde la ferritina aumentando los niveles citoplásmicos de este metal. También se han descrito menores niveles de ferritina en LCR de la EP, lo que aumentaría el nivel de hierro libre (Dexter et al, 1990).

El incremento de otros metales como el cobre podría contribuir también al daño oxidante en la EP, pues exceso de este metal podría facilitar su unión a proteínas como la α SYN e inducir su agregación (Wang et al, 2010).

Hay diversos indicadores de que **la sustancia negra en la EP está sujeta a fuerte estrés oxidativo**, y que los niveles de Fe(II) libre están elevados (hasta un 129%) (Sofic et al., 1988; Dexter et al, 1992). Los niveles de **GSH** suelen estar disminuidos un 40%, pero parece ser que dicha disminución no es perjudicial. Sin embargo, un fuerte decremento de GSH se ha detectado en la glía del tejido nigro de pacientes de EP, lo que podría potenciar los efectos tóxicos sobre la glía y activarla. La formación excesiva de ERO y ERN en la EP aumenta el daño oxidante en proteínas, lípidos y ADN en sustancia negra. Así los niveles de proteínas carboniladas, marcadores de oxidación proteica, están aumentados dos veces en la sustancia negra de enfermos de EP. Los niveles de hidroperóxidos lipídicos, marcadores de oxidación de lípidos, están aumentados diez veces. Finalmente, la 8-hidroxiguanosina, un marcador de ARN y ADN oxidado, también está aumentada en la sustancia negra más de tres veces.

El fuerte estrés oxidativo en la sustancia negra (y otras estructuras comentadas) puede llevar a un plegamiento anormal de proteínas como la α -sinucleína y la parkina. La α SYN mal plegada (en forma de hélice beta en vez de la normal hélice alfa) tiende a precipitar en forma de protofibrillas que a su vez precipitan más sólidamente en forma

de fibrillas que constituyen el núcleo del cuerpo de Lewy. Aunque se ha propuesto que los cuerpos de Lewy son un mecanismo citoprotector, a través del cual la célula “aisla” proteínas tóxicas, Hurtig et al. (2000) han demostrado en la Universidad de Pensilvania que cuanto mayor es el número de cuerpos de Lewy mayor es la gravedad de la EP.

La pérdida de α SYN también altera la normal función vesicular llevando a un exceso de dopamina intracelular, que contribuiría a aumentar el estrés oxidativo. Además, la acumulación de α SYN anormal puede saturar y perjudicar la función de la vía de la ubiquitina-proteasoma (UPP), que como se ha dicho anteriormente es un sistema celular que normalmente degrada proteínas anómalas, mal plegadas o dañadas. La neurodegeneración se puede explicar por el estrés oxidativo y la alteración de la UPP, aunque otros mecanismos como disfunción mitocondrial, excitotoxicidad e inflamación parece ser que también participan. El estudio de posibles alteraciones en los niveles de proteínas relacionadas con los mecanismos de estrés oxidativo, se convierte en un parámetro de estudio de gran relevancia para discernir las posibles causas de la enfermedad y la consecución de una terapéutica eficaz.

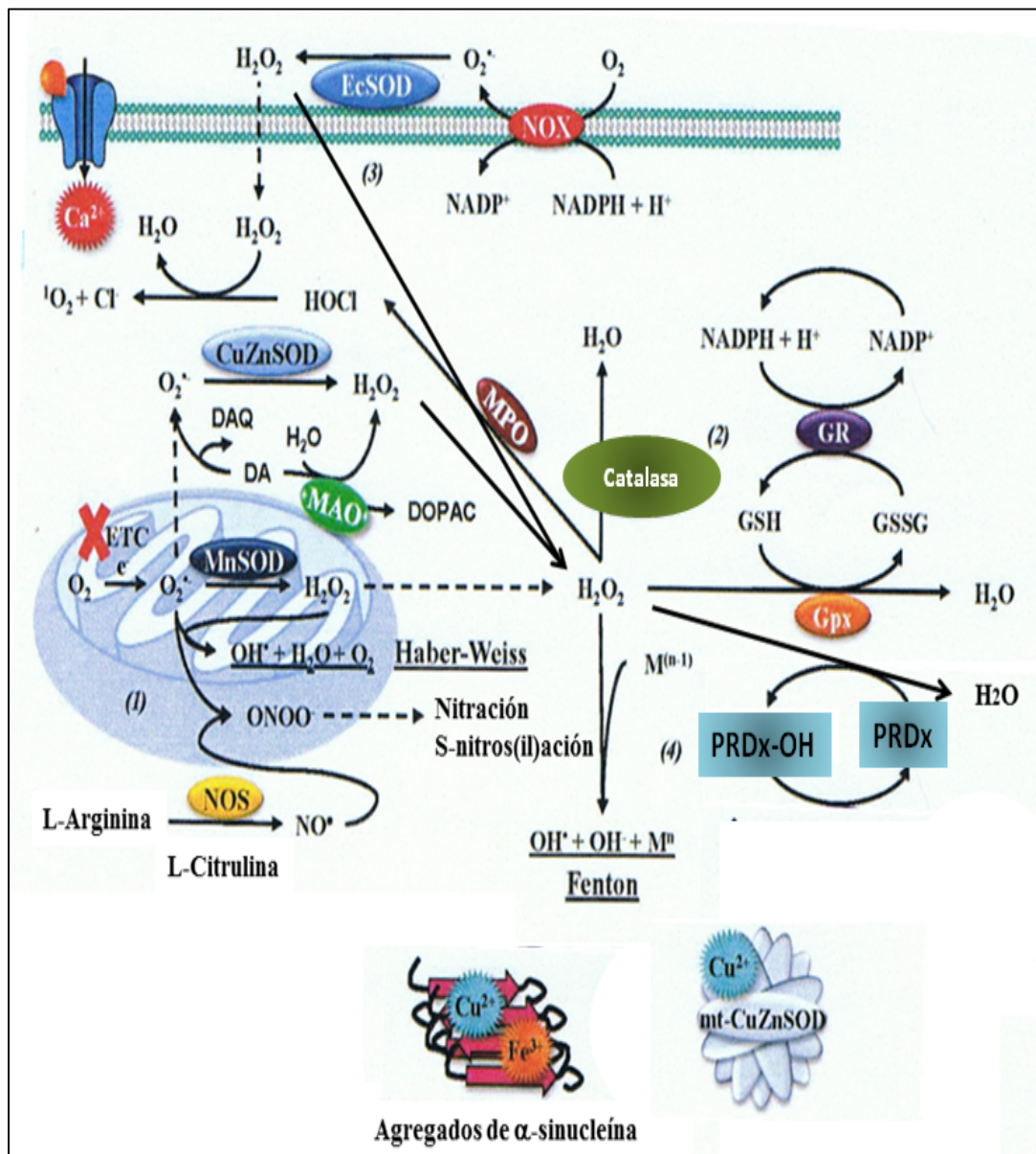


Figura 15. Vías de estrés oxidativos en la enfermedad de Parkinson (modificado de Navarro-Yepes et al, 2015).

Explicación de la Figura 15:

(1) En la EP también tiene lugar una oxidación de la dopamina neuronal, dando lugar a quinonas y agua oxigenada, y hay también exceso de ion superóxido y agua oxigenada mitocondrial, lo que activa la vía de Haber-Weiss y la de NO. El exceso de radicales oxidantes ocasiona el mal plegamiento de proteínas como la α -sinucleína, que se deposita en forma de agregados en las neuronas (cuerpos de Lewy); o el daño oxidante de la CuZnSOD anulando su funcionalidad. Esto ocasiona una menor defensa antioxidante. La nitración/S-nitros(il)ación de otras enzimas antioxidantes, como PRDx o GPX también anula su capacidad antioxidante.

(2) Se cree que en la EP hay una menor actividad de catalasas, del sistema glutatión y de las peroxirredoxinas (ello se ha observado en LCR por nuestro grupo como se detalla en la tesis), lo que ocasiona estrés peroxidativo con exceso de agua oxigenada, activando reacciones del tipo Fenton o Haber-Weiss, con producción de radicales oxidantes.

(3) La vía dependiente de NOX está hiperactiva en la EP y ocasiona una mayor apertura de canales de calcio y entrada de calcio en las células. Esto ocasiona la activación de NOS.

(4) En la EP se sabe que hay un exceso de H_2O_2 y de metales como Fe(II) o Cu(II) puede dar lugar a nuevos EROs por la vía de Fenton. La vía de Fenton también influye en una mayor agregación proteica.

Los estudios bioquímicos y proteómicos de LCR en enfermos de Parkinson no son abundantes (revisado en Van Dijk, 2010). Los estudios realizados por otros autores permiten afirmar que en la enfermedad se desarrolla un proceso oxidante cerebral.

El grupo de Waragai y Hashimoto en Japón (2006) ha descrito una mayor presencia en LCR de la proteína DJ-1 (PARK7) en estadios iniciales de la EP (Yahr I-II) respecto a personas sanas. DJ-1 es una proteína antioxidante, y su pérdida de función se relaciona con una forma de EP familiar (Choi et al., 2006).

Sin embargo, Hong et al. (2010) han detectado que los niveles de DJ-1 están realmente disminuidos en las fases I y II de la enfermedad de Parkinson, pues han comprobado que la contaminación con sangre del LCR explica los altos niveles detectados por Waragai y Hashimoto (el eritrocito normalmente contiene DJ-1). Este resultado indicaría que hay un déficit de un importante marcador antioxidante en LCR de la EP, lo que sugiere que hay mayor “vulnerabilidad” al **estrés oxidativo** en fases iniciales de la enfermedad. La presencia de estrés oxidativo también fue corroborada por Buhmann et al (2004), que detectaron mayores niveles de productos de oxidación lipídica en LCR de EP. El incremento de otros dos indicadores de estrés oxidativo, como malondialdehído, la forma oxidada de coenzima-Q y la 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, también se ha detectado en estadios iniciales de LCR en EP (Ilic et al, 1999; Isobe et al., 2010). Se afirma que los cambios detectados no son específicos de la EP, porque también pueden aparecer en enfermedades neurodegenerativas en las que subyace un estrés oxidativo, como la atrofia multisistémica (Lee et al., 2006). Zhang et al (2008) han definido un perfil “múltiple” con marcadores que también se identifican en el LCR de enfermos de Alzheimer, aunque, según ellos, a un menor nivel. Este perfil incluye tau, BDNF, interleucina 8, beta2-microglobulina, apo-II y apoE.

Otros autores, empleando 2D-PAGE e iTRAQ han identificado 73 proteínas aumentadas en EP (C3, H, C4, α 2-macroglobulina, etc), pero también se expresan en la enfermedad de Alzheimer o en la esclerosis múltiple (Abdi et al., 2006). Parece necesario determinar un perfil bioquímico más específico y predictivo del LCR en la EP en relación al **estrés oxidativo**.

Por otra parte, a nivel plasmático, diversos estudios indican que hay un incremento de **productos de exceso de oxidación** en suero, como 8-HdG, coenzima-Q oxidada y malondialdehído, y que su nivel se correlaciona con la severidad de la enfermedad (Prigione et al., 2006; Chen et al., 2009; Isobe et al. 2010).

Además, se ha detectado incremento de lípidos oxidados en plasma, como hidroperóxidos lipídicos (Arlt et al., 2000) y **niveles reducidos de glutatión**, proteína antioxidante principal (Fitzmaurice et al, 2003). La enzima antioxidante hemooxigenasa 1 (HO-1) se encuentra elevada en sangre de EP, probablemente como reacción al estrés

oxidativo (Mateo et al, 2010). Todo estos datos corroboran la existencia de un estrés oxidativo en la enfermedad de Parkinson, y que se relaciona con la severidad de la EP.

A este respecto, como el estrés oxidativo es una de las causas principales de la neurodegeneración (Jenner, 2003), sería necesario determinar de un modo exhaustivo los niveles de las principales moléculas antioxidantes de las neuronas de la sustancia negra, cuyos niveles podrían estar alterados en LCR. Las moléculas antioxidantes son el glutatión, así como las enzimas antioxidantes (glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glutatión-S-transferasa, superóxido dismutasa y catalasas). Hasta la fecha los resultados con tejido cerebral o LCR indican que hay un déficit de glutatión en la EP (Perry et al., 1982; Sian et al., 1994), sin cambios de glutatión-S-transferasa, glutatión reductasa o catalasas. Los datos sobre glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa son contradictorios (Kish et al., 1985; Damier et al., 1993; Sian et al, 1994; Guo et al., 2009), y los cambios en glutatión parecen no ser selectivos de la EP según Fitzmaurice y su equipo (2003).

El nivel de oxidación en fluidos biológicos, como el LCR, se puede evaluar también mediante el estudio de las llamados proteínas con oxidación avanzada (AOPP; Witko-Sarsat, 1996), además de la presencia de lípidos oxidados, principalmente hidroperóxidos lipídicos (Arlt et al., 2000). La presencia de AOPP se relaciona con halogenización de proteínas y aminos, y la unión de AOPP a la albúmina (presente tanto en suero como LCR) induce la producción de factores proinflamatorios y de adhesión celular (Witko-Sarsat, 1996). Nuestro equipo de investigación ha detectado aumento de AOPP en suero y LCR de enfermos de Párkinson, indicativo de un proceso oxidativo halogenativo (García-Moreno et al, 2013).

Además, es sabido que la presencia células muertas de la sustancia negra en los pacientes con EP está asociada con incremento del contenido de hierro junto con reducción de los niveles promedio de ferritina, proteína de almacenamiento del hierro (Dexter et al, 1990). La ferritina está ligada a una tercera parte del hierro del encéfalo, y bajos niveles de ferritina podrían incrementar el hierro libre. Los cambios en el nivel de ferritina en el LCR no están bien documentados (Bradbury, 1997).

Los niveles de **GNF** no se han estudiado en líquido cefalorraquídeo (uno de los objetivos de esta tesis doctoral), pero se sabe que el contenido de GDNF en el sistema

nigroestriado y la expresión de sus receptores cRet y GRF α 1 no están alterados en la EP (Walker et al, 1998; Mogi et al., 2001; Bäckman et al. 2006). Algunos autores han detectado incluso una regulación al alza de los niveles de ARNm de GDNF (Isoforma I) en el tejido putaminal de enfermos de Parkinson avanzado (Bäckman et al, 2006).

Respecto a otros miembros de la familia GFL, La **Neurturina** previene la degeneración de neuronas dopaminérgicas maduras en diversos modelos animales (Horger et al., 1998; Rosenblad et al., 1999; Fjord-Larsen et al., 2005; Biju et al., 2013), y podría ser una herramienta terapéutica en la EP (Kordower and Bjorklund 2013).

La **PSPN** regula la función de neuronas de dopamina nígricas (Akerud et al. 2002), y actúa sinérgicamente con neurturina para prevenir la pérdida de neuronas de dopamina en diversos modelos animales de EP (Rosenblad et al. 2000; Akerud et al. 2002).

La **artemina** posee efectos equivalentes a GDNF en modelos animales de EP (Rosenblad et al. 2000).

Dentro de la familia TGF de factores neurotróficos, las principales isoformas a nivel cerebral son **TGF β ₁** y **TGF β ₂**. Ambos factores transformantes son potentes reguladores de respuestas inflamatorias en el SNC (Wyss-Coray et al. 2001; Hirsch et al. 2012) pero, como se ha comentado, también pueden comportarse como neuroprotectores para neuronas dopaminérgicas, sobre todo si actúan sinérgicamente con factores GFL (Krieglstein et al. 2002). Al igual que el GDNF, TGF β ₁ estimula el crecimiento de neuritas en las neuronas de dopamina, y es un cofactor del GDNF que potencia de modo sinérgico su acción in vivo (Krieglstein et al. 1998a, 1998b; Schober et al. 1999; Gonzalez-Aparicio et al. 2010). La combinación de TGF β ₁ y PSPN es también un cocktail potente que facilita la generación de neuronas dopaminérgicas y podría ser una terapia en la EP (Roussa et al. 2008). Sin embargo, parecen ser potentes factores neuroinflamatorios per se. Ambos TGF β ₁ y TGF β ₂ se encuentran aumentados en el LCR de pacientes de Parkinson (Mogi et al, 1995; Vawter et al, 1996), y forman parte de la respuesta neuroinflamatoria exagerada de astrocitos y microglía cerebrales propia de la neurodegeneración. En la sustancia negra de los pacientes de EP se ha detectado aumento de factores inflamatorios como TGF β ₁ (Hirsch et al, 2012). Ambos factores se estudian en

el presente trabajo doctoral con el fin de comprender mejor su posible papel neuroinflamatorio o neuroprotector en la EP.

Finalmente, otro factor relacionado con la neuroprotección/neuroinflamación y el envejecimiento es el **BDNF** (Brain-Derived Neurotrophic factor). El factor BDNF se expresa abundantemente en tejido cerebral y en LCR, y es conocido que se afecta tanto en el envejecimiento como en la EP (Korhonen et al, 1998; Xia et al, 2000; Albrecht et al, 2006). En el envejecimiento, se postula que la exagerada respuesta neuroinflamatoria mediada por IL-1 β , propia del envejecimiento y de la neurodegeneración, causa un decremento de la producción de BDNF (Patterson, 2014), aunque otros autores afirman lo contrario (Mogi et al, 1999). En la EP, la expresión de BDNF se reduce en el cerebro de los pacientes, de modo que sólo el 10% de neuronas de la sustancia negra expresan dicho factor, en comparación al 50% en los sujetos normales (Mogi et al, 1999; Murer et al, 2001).

Si el BDNF es un factor protector de neuronas de dopamina, su posible déficit funcional podría participar en la neurodegeneración dopaminérgica en la EP (Altar et al, 1992; Sauer et al, 1993; Nishimura et al, 2005). De hecho, variaciones genéticas del gen de BDNF se asocian a EP familiar (Karamohamed et al, 2005). Sin embargo, otros estudios indican que los niveles de BDNF aumentan en el LCR de pacientes de EP (Salehi y Mashayekhi, 2009). Estos autores interpretan que, debido a que el BDNF es liberado por microglía, la mayor reactividad de la misma en la EP induce un incremento de los niveles en LCR. El incremento de BDNF sería por tanto paralelo, y no opuesto, al de citocinas liberadas por la microglía reactiva como IL-1 β y TNF- α (Mogi et al, 1999). Por otra parte, diversos autores indican que el BDNF protege a las neuronas del daño por infecciones y traumas, facilitando la actividad hipocámpica (Petzold, 2013; Patterson, 2014). Su déficit se podría relacionar por tanto con trastornos mnésicos. Debido a resultados dispares, en esta tesis doctoral se evalúan los niveles de BDNF en LCR en pacientes de Enfermedad de Parkinson y sujetos de edad avanzada.

CAPITULO II – HIPÓTESIS

El Líquido Cefalorraquídeo puede ser considerado testigo directo de las alteraciones a nivel del SNC por su estrecho contacto con el espacio extracelular del encéfalo.

La pérdida de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo y la inflamación son dos fenómenos que están relacionados con senescencia cerebral. Es conocido que la muerte de células dopaminérgicas del mesencéfalo está aumentada con la edad y que esta pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra se estima entre un 4-7% por década de vida (Sherman et al., 1989; Fearnely and Lees, 1991; Budni et al., 2015). La inflamación cerebral parece estar asociada a la activación de la microglía debido a la senescencia (Godbout and Johnson, 2004; Pertusa et al., 2007; Ritzel et al., 2015). Déficit de factores neurotróficos y estrés oxidativo podrían favorecer estos fenómenos asociados a la edad.

Considerando los factores neurotróficos que están relacionados con las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, la supervivencia de esta población neuronal estaría dependiendo críticamente de estos “factores dopaminotróficos”, como son los Ligandos de la Familia relacionada con la línea de las células Gliales GFL y el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro BDNF. La familia GFL incluye el Factor Neurotrófico Derivado de la línea Glial GDNF, Neurontina NRTN y Persefina PSPN (Lin et al., 1993; Krieglstein et al., 1998; Rosenblad et al., 1999; Airaksinen and Saarma, 2002; Fjord-Larsen et al., 2005).

La inflamación cerebral podría estar exacerbada, al menos en parte, por factores tróficos de la familia de Factores Transformadores del Crecimiento como son el $TFGB_1$ y $TFGB_2$. Estos ligandos están relacionados con la actividad de la microglía y son considerados como factores proinflamatorios (Unsicker et al., 1991; Wys _Coray et al., 2001; Hirsch and Hunot, 2009; Hischet al., 2012).

Está ampliamente aceptado que el envejecimiento cerebral podría estar acelerado por la acción dañina de las especies reactivas de oxígeno (Harman 1956, Gerschman et al., 1964; Barja, 2014). El organismo posee defensas antioxidantes las cuales “barren” los radicales libres y minimizan sus efectos, pero parece que estas defensas reducen su eficacia con el envejecimiento (Jenner, 2003; García-Moreno et al,

2013; Navarro-Yepes et al, 2014). Como consecuencia , especies reactivas podrían participar en el desarrollo del envejecimiento celular (Barja 2014).

El estrés oxidativo puede estar causado también por la acumulación de metales reactivos como el hierro o el cobre. La proteína almacenadora de hierro Ferritina, la cual ejerce un papel de protección antioxidante reduciendo el hierro libre reactivo, podría verse afectada en el cerebro durante el envejecimiento. La Ferritina une un tercio del hierro total, de modo que un aumento de la misma reduciría el hierro libre y el estrés oxidativo asociado a metales, ejerciendo un posible papel protector (Dexter et al, 1990; Bradbury, 1997; Navarro-Yepes et al, 2014).

El envejecimiento se ha asociado a numerosas enfermedades neurodegenerativas, compartiendo en algunos casos teorías etiopatogenicas asociadas a estrés oxidativo y a neuroinflamación, como puede ocurrir en el Deterioro Cognitivo Leve ó en la Enfermedad de Parkinson.

Las hipótesis que se plantean en este tesis son:

1. Durante el Envejecimiento Normal podrían encontrarse alterados en el Liquido Ceforraquídeo algunos parámetros relacionados con la neuroinflamación y la pérdida de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo como factores neurotróficos y enzimas antioxidantes.
2. Dicha alteración asociada al Envejecimiento Normal podría encontrarse exacerbada en situaciones patológicas relacionadas con el envejecimiento como son el Deterioro Cognitivo Leve o la Enfermedad de Parkinson

CAPITULO III – OBJETIVOS

El objetivo de este estudio fue analizar en el liquido cefalorraquídeo de sujetos envejecidos parámetros neurotróficos y de estrés oxidativo que pudieran estar relacionados con la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo y con la neuroinflamación, tanto en el Envejecimiento Normal como en situaciones patológicas relacionadas con el envejecimiento como son el Deterioro Cognitivo Leve y la Enfermedad de Parkinson.

Los parámetros estudiados en el liquido cefalorraquídeo de los sujetos son:

1. Niveles de factores dopaminotróficos BDNF, GDNF, persefina, neurturina.
2. Niveles de factores tróficos proinflamatorios TGFB₁ y TGFB₂
3. Actividad de las principales enzimas antioxidantes, glutatión-peroxidasa, glutatión-reductasa, catalasa, glutatión-S-transferasa, peroxirredoxinas y superóxido-dismutasas.
4. Niveles de ferritina, proteína con actividad antioxidante por su capacidad de ligar hierro libre.
5. Potencial antioxidante total del fluido mediante el test de PAO.

CAPITULO IV – MATERIAL Y MÉTODO

Este proyecto fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Sevilla el 27 de mayo de 2010, y por la Comisión de Ética e Investigación Sanitaria del Hospital Universitario Macarena el 19 de mayo del mismo año. Ambos documentos se adjuntan como archivos anexos.

Los documentos de consentimiento informado aprobados por los mencionados Comités se adjuntan también en los anexos correspondientes.

4.1. SUJETOS PARTICIPANTES

El LCR para realizar el análisis de factores tróficos y de oxidación se extrajo de tres tipos de sujetos:

- I. Sujetos con Envejecimiento Normal: Sujetos adultos voluntarios sin patología neurológica programados para ser intervenidos quirúrgicamente en el Bloque Quirúrgico del Hospital Universitario Virgen Macarena, de cirugía traumatológica de miembros inferiores o cirugía abdominal infra umbilical. En el Plan Anestésico de estos sujetos se planteaba como técnica de elección la anestesia loco regional neuroaxial intradural mediante punción lumbar. A través de la misma punción lumbar por la que iba a practicar la anestesia intradural, se extraía LCR previo consentimiento informado del sujeto.
- II. Sujetos con diagnostico de Deterioro Cognitivo Leve: Sujetos adultos voluntarios que tenían entre sus antecedentes el diagnóstico de Deterioro Cognitivo Leve, programados para ser intervenidos quirúrgicamente en el Bloque Quirúrgico del Hospital Universitario Virgen Macarena
- III. Sujetos con diagnóstico de Enfermedad de Parkinson: Sujetos diagnosticados de Enfermedad de Parkinson por el Servicio de Neurología del Hospital Virgen Universitario Macarena.

De todos los sujetos participantes en el estudio se recogieron los siguientes datos clínicos:

- edad en años
- género
- peso en kilogramos
- talla en centímetros
- índice de masa corporal en kg/m^2
- hábito tabáquico en cigarrillos/día
- ingesta de alcohol en cantidad semanal
- bebedor de café
- tomador de suplementos de vitaminas A, E, C
- presencia de patologías del tipo:
 - hipertensión arterial.
 - disfunción tiroidea (hipertiroidismo e hipotiroidismo diagnosticados y en tratamiento) .
 - dislipemia.
 - síndrome ansioso/depresivo.
 - deterioro cognitivo leve.
- La obesidad mórbida se consideró cuando el IMC fue superior a 35 kg/m^2 .
- Fumar se definió como fumador diario de cigarrillos o fumador ocasional, aunque no fume diariamente.
- El exceso de alcohol se definió como el consumo de más de 210 g de alcohol a la semana.
- Bebedor de café fue considerado cuando la ingestión diaria superaba los 300 ml.
- La toma de suplementos vitamínicos se consideró cuando la toma era diaria de vitamina A o vitamina E o vitamina C.
- La hipertensión arterial se consideró como tal cuando la medida repetida de presión arterial excedía 140 mmHg (sistólica) y/o 90 mmHg (diastólica), o cuando el sujeto tomaba medicación antihipertensiva para controlar la hipertensión.

- La disfunción tiroidea se consideró cuando existía diagnóstico clínico y tratamiento de hiper o hipotiroidismo.
- La dislipemia se consideró cuando los niveles de colesterol superan los 200 mg/dl, los triglicéridos superan 250 mg/dl y los de HDL son inferiores a 35 mg/dl. O el sujeto tomaba hipolipemiantes.
- Síndrome ansioso-depresivo se consideró cuando el sujeto tomaba de forma habitual ansiolíticos y/o antidepresivos.
- La presencia de “Deterioro Cognitivo Leve” (DCL) se evaluó según las recomendaciones del Servicio de Psiquiatría del hospital. La cognición se valora con el test de aprendizaje verbal de Rey (*Rey verbal learning test* o RAVLT, versión en español), la cual es muy sensible para distinguir los sujetos con DCL a través de la evaluación verbal (Ryan and Geisser, 1986; Estéves-González et al, 2003), así como la versión española del test de examen del estado mini-mental (*Mini-Mental State Examination test* o MMSE), que evalúa diferentes aspectos cognitivos (Folstein et al, 1975; Lobo et al, 1979; Manubens et al, 1998). El punto-de-corte (*cut-off*) de la versión española del MMSE es 23/24 (rango, 0-35). Además, se evaluaron las actividades de la vida diaria (*activities of daily living* o ADL) pues numerosos estudios avalan como sujetos en estado preclínico de Demencia o Deterioro Cognitivo Leve presentan falta de habilidades instrumentales ADL (Perneczky et al, 2006; Jefferson et al, 2008). Las capacidades instrumentales en actividades diarias son medidas con la versión española de las escalas de Lawton-Brody y Pfeffer (Lawton y Brody, 1969; Pfeffer et al, 1982; Olazarán et al, 2005; Montejo-Carrasco et al, 2012) las cuales valoran el nivel de independencia en las ADL. El punto-de-corte (*cut-off*) de la escala de Lawton-Brody era 19/20 (rango, 0-25), y el de la escala de Pfeffer, que permite una mejor discriminación de la demencia, era 6/7 (rango, 0-33). Uno de los dos test debía ser positivo para diagnosticar DCL.
- El diagnóstico de Enfermedad de Parkinson estaba basado en criterios clínicos y prueba SPECT positiva, (Single Photon Emission Computed Tomography). Los pacientes de EP se clasificaron según los estadios de la

escala de Hoehn-Yahr, la escala UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale (Fahn y Elton, 1987)), y la duración de la enfermedad en años. La duración en años se calculó según el momento del primer síntoma manifestado por el enfermo.

✓ La Escala de Hoehn Yahr (De Hoehn MM, Yahr MD., 1977) es una escala de evaluación neurológica que clasifica a los pacientes en cinco estadios en función de la sintomatología:

- Estadio 1: enfermedad exclusivamente unilateral.
- Estadio 2: afectación bilateral sin alteración del equilibrio.
- Estadio 3: cierta inestabilidad postural pero físicamente independiente.
- Estadio 4: incapacidad grave aun capaz de caminar: Marcha Parkinsoniana
- Estadio 5: estado caquético.

Se evaluaron enfermos de estadio 1 a 4.

- Los de estadio 1 y 2 se agruparon en EP temprana.
- Los de estadio 3 y 4 se agruparon en EP avanzada o tardía.

✓ La escala UPDRS, Unified Parkinson's Disease Rating Scale es un sistema de clasificación para seguir el curso longitudinal de la EP. Consta de tres secciones, puntuando de 0 a 4 en cada una de las subsecciones

- Sección I: estado mental, conducta y humor
- Sección II: actividades de la vida diaria
- Sección III: escala motora
- Sección IV: complicaciones secundarias al tratamiento

La cantidad total de puntos puede ser 199, donde 199 representa incapacidad total y 0 ninguna incapacidad.

En el examen motor UPDRS III se valora de 0 a 4 puntos el lenguaje, expresión facial, temblor de reposo en cara y las cuatro extremidades de forma independiente, temblor postural o de acción, rigidez, tocarse la punta de los dedos, movimientos de manos en rápida sucesión, (abrir y cerrar, pronación y supinación) agilidad en las piernas, levantarse de una silla, postura, marcha, estabilidad postural, bradicinesia/hipocinesia.

Tabla 3. Edad y datos clínicos de los sujetos de Envejecimiento Normal o con DCL recogidos desde el Estudio Preanestésico con el número de muestra de LCR (n=64).

	MUESTRA	SEXO	EDAD	FUMA	BEBE	I QUIRURGICA	HTA	OB MOR	DLP	ANS-DEP	D TIR	DET. COG
1	3826989	V	68	NO	NO	FX DE CADERA	SI	NO	NO	SI	NO	NO
2	3826991	H	66	NO	NO	FX DE CADERA	NO	NO	NO	NO	NO	NO
3	3826988	V	63	NO	NO	FISURA ANAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO
4	4922946	V	61	NO	NO	H INGUINAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO
5	4922949	H	51	NO	NO	FISURA ANAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO
6	4922950	H	65	SI	NO	FISURA ANAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO
7	4922947	V	61	NO	NO	VASCULAR MII	NO	NO	NO	NO	SI	NO
8	4922981	V	70	SI	NO	HEMORROIDES	NO	NO	NO	NO	NO	NO
9	4922982	V	62	SI	NO	HEMORROIDES	NO	NO	NO	NO	NO	NO
10	4273820	V	79	NO	NO	CÍA VASCULAR	NO	NO	NO	NO	NO	NO
11	5162823	V	86	NO	NO	H INGUINAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO
12	5162825	V	83	NO	NO	H INGUINAL	SI	NO	NO	NO	NO	NO
13	4951408	H	82	NO	NO	FX CADERA	NO	SI	NO	NO	NO	NO
14	3826993	V	70	NO	SI	H INGUINAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO
15	3817772	V	56	SI	NO	CA.RECTO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
16	3817773	H	76	NO	NO	HEMORROIDES	NO	NO	NO	NO	NO	NO
17	3817774	V	65	SI	NO	HERNIORRAFIA	SI	NO	SI	NO	NO	NO
18	3817775	V	34	SI	NO	FÍSTULA PERIANAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO
19	3826996	V	86	NO	NO	H UMBILICAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO
20	3826999	V	55	NO	NO	FISTULA PERIANAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO
21	270400	H	60	NO	NO	POLIPOS COLÓN	NO	NO	SI	NO	NO	NO
22	3817772	V	52	SI	NO	CA DE RECTO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
23	3817774	V	65	NO	NO	HERNIA INGUINAL	SI	NO	NO	NO	NO	NO
24	3817775	V	34	SI	NO	FISTULA ANAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO
25	3826994	V	77	NO	NO	HERNIA INGUINAL	SI	NO	SI	NO	NO	NO
26	270400	H	60	NO	NO	POLIPOS COLON	NO	NO	NO	NO	NO	NO
27	3826997	H	57	NO	NO	CIRUGIA DE RECTO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
28	3826998	V	54	NO	SI	HEMORROIDES	SI	NO	SI	NO	NO	NO
29	5965651	V	52	SI	SI	FISURA ANAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO
30	5966579	V	69	NO	NO	HERNIA INGUINAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO
31	5966596	V	49	SI	NO	HEMORROIDES	NO	NO	NO	NO	NO	NO
32	5966580	V	69	SI	NO	HERNIA INGUINAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO
33	5966582	V	81	NO	NO	EVENTROPLASTIA	NO	NO	NO	SI	NO	NO
34	5965635	V	49	NO	NO	FISTULA ANAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO
35	6321134	V	76	NO	NO	PROLAPSO RECTAL	SI	NO	NO	SI	NO	SI

36	5966956	H	47	NO	NO	CIA DE PERINÉ	NO	SI	SI	NO	NO	NO
37	6321142	H	29	SI	NO	FISTULA ANAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO
38	5966972	V	41	SI	NO	FISURA ANAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO
39	6321222	H	72	NO	NO	EVENTRACIÓN	SI	NO	NO	NO	SI	NO
40	6321223	V	84	NO	NO	HERNIA INGUINAL	SI	NO	NO	NO	NO	NO
41	5966963	V	26	NO	NO	HERNIA INGUINAL	NO	NO	NO	NO	SI	NO
42	6321191	H	56	NO	NO	HEMORROIDES	NO	NO	NO	NO	NO	NO
43	6321192	H	47	SI	NO	ESFÍNTER ANAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO
44	5966971	H	23	SI	NO	FISTULA PERIANAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO
45	5966966	H	56	NO	NO	CIRUGÍA ANAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO
46	6321358	H	77	NO	NO	FX CADERA	SI	NO	SI	NO	NO	SI
47	6321360	H	81	NO	NO	FX DE CADERA	SI	NO	SI	NO	SI	SI
48	6321368	H	87	NO	NO	FXA DE CADERA	NO	NO	NO	SI	NO	SI
49	5966964	V	58	NO	NO	FISTULA ANAL	SI	NO	SI	NO	NO	NO
50	5965636	V	50	SI	NO	FX CADERA	NO	NO	NO	NO	NO	NO
51	5965640	H	61	NO	NO	RODILLA	NO	NO	NO	NO	SI	NO
52	5965639	H	75	NO	NO	PTR	NO	SI	SI	NO	NO	NO
53	5965638	H	54	NO	NO	PTC	NO	NO	NO	NO	NO	NO
54	5965637	H	76	NO	NO	PTR	SI	NO	NO	NO	NO	NO
55	6321401	H	67	NO	SI	HERN INGUINAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO
56	6321287	H	35	NO	NO	F ANAL	NO	NO	SI	NO	NO	NO
57	6341279	H	72	SI	NO	F ANAL	SI	NO	NO	NO	NO	NO
58	6321447	H	67	SI	NO	H INGUINAL	NO	NO	SI	NO	NO	NO
59	6321219	H	77	SI	SI	H INGUINAL	SI	NO	SI	NO	NO	NO
60	5966967	H	46	NO		H UMBILICAL	NO	SI	SI	NO	NO	NO
61	3826995	M	75	NO	NO	FX CADERA	NO	NO	NO	NO	NO	SI
62	40402	M	76	NO	NO	FISURA ANAL	NO	NO	NO	NO	NO	SI
63	170301	M	89	NO	NO	FX CADERA	NO	NO	NO	NO	NO	SI
64	170302	H	80	NO	NO	HERNIA INGUINAL	NO	NO	NO	NO	NO	SI
	MUESTRA	SEXO	EDAD	FUMA	BEBE	I QUIRÚRGICA	HTA	OB MOR	DLP	ANS-DEP	D TIR	DET. COG

Tabla 4. Edad y datos clínicos de los sujetos con Enfermedad de Parkinson recogidos de su historia clínica con el número de muestra de LCR (n=29).

	Nº MUESTRA	SEXO	EDAD	FUMADOR	BEBEDOR	INICIO	DIAGNOSTICO	HTA	DLP	ENF. CV
1	251001	H	54	NO	NO	1999	2008	NO	NO	NO
2	251000	H	64	NO	NO	2003	2005	SI	NO	NO
3	81100	H	69	NO	NO	1994	1997	SI	NO	SI
4	291100	M	68	NO	NO	1998	2002	NO	NO	NO
5	221100	H	76	NO> 20 A	NO	2002	2005	NO	NO	NO
6	221101	M	75	NO	NO	2002	2006	SI	SI	SI
7	181001	H	75	NO> 7 A	NO	2005	2007	SI	NO	NO
8	131200	H	54	NO	NO	2002	2006	SI	SI	NO
9	131201	H	53	NO	NO	2000	2001	NO	NO	NO
10	201201	M	66	NO> 40 A	NO	2007	2008	SI	SI	SI
11	201200	M	67	NO	NO	2006	2007	SI	NO	NO
12	181000	M	32	NO	NO	1990	2004	NO	NO	NO
13	3826990	M	61	NO	NO	2004	2005	NO	SI	NO
14	40400	M	54	NO	NO	2008	2008	NO	NO	NO
15	60401	M	50	NO	NO	2005	2007	NO	NO	NO
16	60400	H	71	NO	NO	2007	2008	NO	NO	NO
17	60402	H	72	NO> 10 A	NO	2007	2009	SI	NO	NO
18	40401	M	76	NO	NO	2002	2004	SI	NO	NO
19	290300	H	50	NO	NO	1990	2006	NO	NO	NO
20	230300	H	58	NO	NO	2000	2010	SI	SI	NO
21	170300	M	89	NO	NO	2000	2007	SI	NO	NO
22	160201	H	68	NO> 11 A	NO	2008	2010	NO	NO	NO
23	160202	H	58	NO	NO	2004	2009	NO	NO	NO
24	160200	M	66	NO	NO	2003	2010	NO	NO	SI
25	180500	M	20	NO	NO	1994	2008	NO	NO	NO
26	160203	M	79	NO	NO	2004	2005	NO	NO	NO
27	250502	M	71	NO	NO	1976	2006	SI	SI	NO
28	250501	M	73	NO	NO	1990	2005	SI	NO	NO
29	250500	M	73	NO	NO	2007	2008	NO	SI	NO

H YAHR	UPDRS	UPDRS III	DISCINESIAS	UPDRS IV	SPECT	TRATAMIENTO PARKINSON	
2	53	39		0	BILATER	LEVODOPA(150mg),ROPIRINOL RETARD(16mg),ROTIGOTINA(6mg),RASAGILINA(1mg)	1
2	52	37		0	BILATER	SINEMET PLUS(1-1-1), RASAGILINA(1mg)	2
4	82	47		0	BILATER	LEVODOPA (1400mg).	3
4	63	30	SI	8	BILATER	LEVODOPA (500mg), ENTACAPONE (1000mg), ROTIGOTINA(8mg), RASAGILINA(1mg), AMANTADINE	4
3	49	28	SI	2	BILATER	LEVODOPA (450mg), ENTACAPONE (600mg), MIRAPEXÍN ESTÁNDAR(2.8 mg), RASAGILINA(1mg)	5
3	47	31		0	NO TIENE	MIRAPEXÍN ESTÁNDAR(2.8mg), RASAGILINA(1mg).	6
3	2	1		0	IZQUIERDO	RASAGILINA (1mg)	7
3	54	30	SI	8	BILATER	LEVODOPA(700mg), ENTACAPONE(1000mg), MIRAPEXÍN RETARD(2.1mg), RASAGILINA(1mg).	8
2	14	12		0	BILATER	LEVODOPA (300mg), MIRAPEXÍN ESTÁNDAR(4.2mg), RASAGILINA(1mg),	9
2	28	16		0	BILATER	MIRAPEXÍN ESTÁNDAR (2.1mg), RASAGILINA (1mg).	10
2	18	13		0	BILATER	LEVODOPA(300mg).	11
3	17	14		0	BILATER	LEVODOPA (150mg).	12
3	71	49		0	BILATER	LEVODOPA(300g), ROTIGOTINA(8mg), RASAGILINA(1mg).	13
1	22	19		0	NO	RASAGILINA (1mg)	14
3	15	11		0	BILATER	ROTIGOTINA (16mg), RASAGILINA (1mg).	15
2	40	28		0	BILATER	RASAGILINA (1mg), MIRAPEXÍN RETARDADO (4.2mg)	16
1	11	9		0	BILATER	RASAGILINA (1mg)	17
1	81	47		0	BILATER	LEVODOPA (400mg), ENTACAPONE (800mg), RASAGILINA (1mg)	18
3	44	35		0	BILATER	RASAGILINA (1mg), MIRAPEXÍN RETARDADO (4.2mg)	19
3	31	19	SI	2	BILATER	ROTIGOTINA (22mg), RASAGILINA (1mg).	20
3	66	49		0	NO	LEVODOPA (200mg)	21
1	23	20		0	BILATER	ROTIGOTINA (8mg)	22
2	25	14		0	BILATER	LEVODOPA (300mg)	23
1	48	22		0	BILATER +	ROTIGOTINA (8mg)	24
1	33	24	SI	4	BILATER	LEVODOPA (600mg), RASAGILINA (1mg), TRIHEXIFENIDILO (3mg)	25
4	58	39		0	BILATERA	LEVODOPA (400 mg) ENTACAPONE (800mg) MIRAPEXIM ST (1,05 MG) RASAGILINA (1 mg) AMANTADINE (600 MG)	26
2	32	20		0	BILATER	MIRAPEXIN RETARD(2.1mg),RASAGILINA(1mg)	27
2	24	16		0	BILATER	MIRAPEXIN ESTÁNDAR(2.1mg), RASAGILINA(1mg), BIPERIDENO(1mg).	28
1	24	17		0	BILATER	RASAGILINA(1mg).	29

4.2 RECOGIDA DE MUESTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

El LCR se obtuvo mediante la práctica de punción lumbar, por el autor de la tesis doctoral, o por un neurólogo experto en el caso de los sujetos diagnosticados de EP. La punción se realiza en los espacios lumbares intervertebrales L2-L3 ó L3-L4, para prevenir el posible daño medular. Los pacientes estaban en posición sentada, y se empleaba una aguja de 22 a 25G x 3 1/2". Se recogían por salida espontánea a través de la aguja de punción un máximo de 3 ml de LCR, y se almacenaban en tubos de polipropileno (Eurotube, España) protegidos de la luz; fueron rápidamente alícuotados en alícuotas de 500 microL, etiquetados y congelados a -80 °C para posteriores análisis.

Una muestra de 0,5 ml en tubo de cristal se empleó para observar la ausencia de punción traumática y cuantificar los glóbulos rojos antes de ser almacenados. El LCR con exceso de glóbulos rojos (> 500 células rojas/microL) era desechado.

Simultáneamente a la toma de LCR, se realizó extracción de 5 ml de sangre por punción en la vena cefálica, que fueron recogidos en tubos recubiertos de gel para inducir la coagulación de la sangre y para obtener el suero (BD Vacutainer). El suero se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos para separar el coágulo y las células atrapadas, y luego fue congelado a - 80°C.

4.3 PROCESAMIENTO GENERAL DE LAS MUESTRAS

Las alícuotas de LCR se descongelaron y sonicaron con solución de homogenización (150mM CLNa , 50 mM HEPES, 1mM fuluoruro de fenilmetilsulfonil, 0,6 µm leupeptina, y 1% Triton X-100, pH 7,4).

Para medir los niveles de factores tróficos en LCR de GDNF, persefina, neurturina, TGFβ₁, TGFβ₂, y BDNF se emplearon los siguientes kits comerciales *ELISA (ENZIME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)* siguiendo las instrucciones del fabricante:

- *GDNF E_{max}[®] ImmunoAssay System, ProOmega, USA.*
- *Human Persephin ELISA kit, Wuhan EIAab Science Co. Ltd., China.*
- *Human Neurturin ELISA kit, Wuhan EIAab Science Co. Ltd.*

- *TGF β ₁ E_{max}[®] Immunoassay System, Promega.*
- *TGF β ₂ Human ELISA kit, Abcam, USA.*
- *Human BDNF ELISA Kit, Boster Biological Tech, USA.*

Para medir la actividad de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GR), glutatión-S-transferasa (GST), superóxido dismutasas (SODs), y catalasa se emplearon los siguientes kits comerciales ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante:

- *GR-340 assay kit, Bioxytech Oxis Internacional Inc., Portland, USA.*
- *GPX activity kit 762-100, BioVision, USA.*
- *GST Assay kit K263-100, BioVision.*
- *SODs (superoxide dismutase Activity Assay kit, BioVision, USA)*
- *Catalase activity Assay kit, BioVision, USA.*

GR-340 assay está basado en la oxidación de NADPH a NADP⁺ catalizado por una concentración limitada de glutatión reductasa GR. Una unidad de actividad de GR es definida como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1 μ mol de Glutatión Disulfuro GSSG por minuto a pH de 7,5 y 25°C.

Biovision glutatión peroxidasa assay kit mide la actividad de GPX a través de una reacción acoplada con GR. En el test el GPx reduce el hidroperóxido de Cumeno, y oxida GSH a GSSG. El GSSG generado se reduce a GSH con el consumo de NADPH por la GR. El decremento de NADPH es proporcional a la actividad de GPx en las reacciones. El decremento de NADPH se mide fácilmente por el cambio de absorbancia a 340 nm.

Este kit se basa en la reacción mediada por GST entre GSH y el sustrato de GST, CNBD (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) dando GS-DNB. La reacción forma un tioeter de dinitrofenilo que se puede detectar con espectrofotometría a 340 nm. Una unidad de actividad de GST se define como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de GS-DNB por minuto.

Respecto a la catalasa, esta enzima reacciona con el peróxido de hidrógeno para producir agua y oxígeno, y el peróxido de hidrógeno no convertido reacciona con la prueba para producir un producto que puede ser medido a 570 nm. Una unidad de catalasa se define como la cantidad de Catalasa necesaria para descomponer 1,0 μmol de H_2O_2 por minuto, y bajo las condiciones del kit: pH 4.5 y a 25°C.

EL SOD assay kit mide la inhibición de la actividad de la SOD con la tasa de reducción con un superóxido anión.

La actividad de la Peroxirredoxina se midió siguiendo el método HRP (horseradish peroxidase), basado en la medición de la actividad de la PRDx peróxido-dependiente con peróxido de hidrógeno usando la HRP assay. Los datos se dan como porcentaje de reducción en la absorbancia comparado con el control (LCR de sujetos adulto fue considerado como control o 100%)

Los niveles de Ferritina en LCR se midieron mediante el test ELISA con el siguiente kit comercial siguiendo las instrucciones del fabricante:

- *Ferritin ELISA DB59111: IBL International GMBH, Alemania*

Se analizó la potencial antioxidante total del LCR mediante el

- “*Kit for Potential Anti Oxidant (PAO)*”, adquirido a Nikken Ltd., Japan Institute for the Control of Aging (Jaika), Japón.

Este PAO assay kit facilita un método para medir la capacidad o potencial antioxidante del fluido basado en la reducción del ion cúprico (Cu^{++} a Cu^+). El PAO test puede detectar tanto antioxidantes hidrofílicos tales como vitamina C o glutatión, y antioxidantes hidrofóbicos como la Vitamina E.

También se midieron, mediante pruebas rutinarias de laboratorio, los parámetros básicos del LCR. Estos parámetros rutinarios fueron proteínas totales, glucosa total, pH, densidad y número de leucocitos por microlitro. La densidad se midió a 37°C en un densitómetro que marca la densidad hasta cuatro decimales, y con precisión de 0.00003 g/ml. Se empleó conteo celular de 10 μl de muestra bajo microscopio con una cámara de Neubauer.

Respecto a las proteínas totales, para la detección y cuantificación de la proteína total en LCR se utilizó el siguiente kit comercial y se siguieron las instrucciones del fabricante: *Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay*. Consiste en una formulación compatible con detergente basada en ácido bicinconínico (BCA) para la detección y cuantificación colorimétrica de la proteína total. Este método combina la conocida reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} por la proteína en un medio alcalino (reacción de Biuret) con la detección colorimétrica altamente sensible y selectiva del catión cuproso (Cu^{+1}) utilizando un reactivo único que contiene ácido bicinconínico. El producto de reacción de color morado de este ensayo está formado por la quelación de dos moléculas de BCA con un ion cuproso. Este complejo soluble en agua exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm que es casi lineal con concentraciones de proteína crecientes en un amplio rango de trabajo (20-2000 $\mu\text{g/ml}$). El método BCA no es un verdadero método de punto final, es decir, el color final continúa. Sin embargo, después de la incubación, la velocidad de desarrollo continuo del color es suficientemente lenta para permitir que un gran número de muestras se ensayen juntas.

Los niveles de albúmina e IgG se cuantificaron por nefelometría inmunoquímica estándar en muestras de suero y LCR (sistema de SIEMENS BN II), y se calcularon los índices de albúmina y de IgG (Link y Tibbling, 1977; Lefvert y Link, 1985).

El índice de albúmina normal debe ser inferior a 9. Se ha definido que las bandas oligoclonales de IgG no son detectables en pacientes con índices IgG menores a 0.45, pero índices superiores a 0,77 reflejan síntesis intratecal de IgG. La detección de las bandas oligoclonales de IgG se realizó con método isoeléctrico en geles de agarosa y posterior inmunoblotting mediante el uso de anticuerpos específicos de IgG (Masjuán et al, 2006; Sádaba et al., 2004). Alteraciones en dichos índices indican daño inflamatorio de la barrera hematoencefálica. Aunque no se ha descrito daño de la barrera hematoencefálica en la EP hasta la fecha, es importante estudiar dicho índice en los sujetos porque las personas mayores pueden sufrir de daño relativo de la barrera hematoencefálica, generalmente de origen vascular. Estos índices nos permiten deducir si hay daño de la barrera hematoencefálica, lo que invalidaría los datos obtenidos de LCR, pues reflejaría que los valores proteicos del LCR están “influidos” por los niveles plasmáticos de proteínas.

4.4 MÉTODO ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de las muestras de LCR obtenidas de los 3 tipos de sujetos, las clasificamos en varios grupos en función de la edad y de las características clínicas de los sujetos de las que procedían:

De los **sujetos con Envejecimiento Normal**, obtuvimos 54 muestras válidas de LCR, que en función de la edad los sujetos y, siguiendo el criterio de diversos autores expertos en envejecimiento como Bürger et al (1999) y Maggio et al (2006), se clasificaron en cuatro grupos

- 12 muestras de LCR procedentes de sujetos de 18 a 49 años, denominado de “Adultos Jóvenes”.
- 17 muestras de LCR procedentes de sujetos de 50 a 64 años denominado de “Adultos de Mediana Edad”.
- 13 muestras de LCR procedentes de sujetos de 65 a 74 años denominado de “Envejecimiento Temprano”.
- 12 Muestras de LCR procedentes de sujetos mayores a 74 años denominado de “Envejecimiento Avanzado”.

De los **sujetos con Deterioro Cognitivo Leve**, se obtuvieron 7 muestras y todos los sujetos tenían mas de 74 años de edad por lo que solo se les clasificó en un solo grupo.

De los **sujetos con Enfermedad de Parkinson** obtuvimos 29 muestras y las clasificamos en dos grupos en función de los cuatro estadios de la escala de Hoehn-Yahr y la duración en años de la enfermedad.

- 16 muestras de LCR procedentes de sujetos estadio 1 y estadio 2 de Hoehn-Yahr denominado “Enfermedad de Parkinson Temprana”.
- 13 muestras de LCR procedentes de sujetos estadio 3 y estadio 4 de Hoehn-Yahr denominado “Enfermedad de Parkinson Avanzada”.

De los sujetos adultos voluntarios para ser intervenidos quirúrgicamente con anestesia intradural se reclutó un grupo de 21 sujetos, elegidos al azar, sin ningún déficit neurológico y edad similar a los sujetos con EP (mayores de 60 años), como grupo control, para poder comparar los factores tróficos y de oxidación del LCR con los pacientes diagnosticados de Enfermedad de Parkinson.

- 21 muestras de sujetos control, mayores de 60 años sin daño neurológico.

Respecto a la estadística, las variables cualitativas se han expresado por su frecuencia y porcentaje y han sido comparadas estadísticamente con el test de Chi-cuadrado. Las variables cuantitativas se han expresado por su media, error estándar de la media e intervalo de confianza del 95%. En el análisis estadístico de las variables cuantitativas con más de dos poblaciones o grupos con distribución normal se utilizó el ANOVA de una vía para la comparación por grupos, seguido del test de Newman-Keuls y Student. Si la distribución de algún grupo era no normal, se empleaba el test de Kruskal-Wallis, no paramétrico, seguido del test de la U de Mann-Whitney.

Dos grupos se compararon con el test de la t-Student, y la normalidad en la distribución de datos se verificó con el test de Shapiro-Wilk. Si los datos encontrados ofrecían una distribución no normal, se empleó el test de la U de Mann-Whitney, no paramétrico, para la comparación de dos grupos. La correlación estadística entre las variables fue analizada con el test de correlación de Pearson.

Para el estudio estadístico de esta tesis doctoral se empleó el programa Minitab 16 Statistical Software.

Debido a las limitaciones en la cantidad de LCR, y el número de variables cuantificadas, hay que subrayar que en algunos casos no se evaluaron todos los sujetos de cada grupo, por falta de LCR. En la tabla siguiente se enumeran las n de cada grupo estudiados, tanto en estudio de Envejecimiento Normal, como en el de DCL y EP. Si el grupo era pequeño, con una n menor de 10, se valoraba si la distribución era normal o no, y en su caso se empleaban tests no paramétricos para las comparaciones estadísticas. En todo caso, los sujetos en cada grupo eran elegidos al azar.

Tabla 5. Número de muestras de LCR empleadas en los distintos experimentos procedentes de los sujetos de Envejecimiento Normal o con Deterioro Cognitivo Leve

	Adultos jóvenes	Adultos mediana edad	Envejecimiento temprano	Envejecimiento avanzado	Envejecimiento con DCL
	n=12	n=17	n=13	n=12	n=7
PARÁMETROS BÁSICOS: Proteínas totales, glucosa, etc.					
	11	13	13	11	7
FACTORES NEUOTRÓFICOS					
BDNF	10	12	10	10	7
GDNF	12	13	12	12	7
Persefina	12	13	12	12	6
Neurturina	6	6	6	6	5
TGFβ ₁	10	15	13	12	7
TGFβ ₂	10	15	13	12	7
ENZIMAS ANTIOXIDANTES					
GPX	10	10	10	10	7
GR	12	17	13	10	7
GST	12	17	13	10	7
Catalasa	9	9	9	9	7
SOD	10	12	11	11	7
PRDX	9	9	9	8	6
Ferritina	11	12	11	11	7
PAO	11	13	11	11	7

Tabla 6. Número de muestras de LCR empleadas en los distintos experimentos procedentes de los sujetos con Enfermedad de Párkinson y grupo control

	Controles	EP
	n=21	n=29
PARÁMETROS BÁSICOS: Proteínas totales, glucosa, etc		
.	19	29
FACTORES NEUOTRÓFICOS		
BDNF	21	29
GDNF	21	22
Persefina	21	25
Neurturina	10*	10 *
TGFβ ₁	14	24
TGFβ ₂	15	21
ENZIMAS ANTIOXIDANTES		
GPX	13	25
GR	21	19
GST	14	24
Catalasa	19	29
SOD	17	29
PRDX	14	24
Ferritina	13	25
PAO	14	24

- Se hizo un estudio con 10 muestras y se observó que no era detectable

4.5 ÉTICA

Se obtuvieron los certificados del Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Sevilla y el de la Comisión de Ética e Investigación Sanitaria del Área Hospitalaria Virgen Macarena de Sevilla previo al inicio del estudio (Ver anexos).

Se obtuvo Consentimiento informado previamente a la extracción de LCR de todos los sujetos, tanto de los sujetos propuestos para intervención quirúrgica como de los sujetos diagnosticados de Enfermedad de Parkinson. Los documentos de consentimiento informado se realizaron de acuerdo a la Declaración de Helsinki (BMJ 1991; 302: 1194). Véanse los anexos correspondientes.

CAPITULO V – RESULTADOS

5.1 RESULTADOS DE ENVEJECIMIENTO NORMAL O CON DETERIORO COGNITIVO LEVE

5.1.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS SUJETOS DE ENVEJECIMIENTO NORMAL AGRUPADOS POR EDAD.

Tabla 7 Características clínicas de los sujetos de Envejecimiento Normal agrupados por edad.

Grupos de edad (numero de sujetos por grupo)	18-49 años (n=12)	50-64 años (n=17)	65-74 años (n=13)	>74 años (n=12)
Edad media (años)	39,7±5	57,3±4	68,1±5	80,1±3
Varones/mujeres	6/6	10/7	4/9	8/4
Fumador	58%	23,5%	46%	0%
Bebedor	0%	11,7%	15,3%	0%
Hipertensión arterial	0%	11,7%	40% *	50% *
Dislipemia	8%	17,6%	15,3%	16%
Síndrome ansioso/depresivo	0%	0%	7,6%	8%
Disfunción tiroidea	8%	5,8%	7,6%	16%
Deterioro Cognitivo Leve	0%	0%	0%	58% *

Media ± EEM,

* $p < 0.05$ respecto a subgrupo de jóvenes adultos y subgrupo de adultos de mediana edad.

Se observaron algunas diferencias significativas entre la población más envejecida respecto a la población menos envejecida:

- La hipertensión arterial fue mas prevalente en los sujetos mayores de 65 años ($p < 0,05$, Chi cuadrado) tanto en el subgrupo de envejecimiento temprano como en el de envejecimiento avanzado respecto a los menores de 65 años.

- Todos los sujetos que tenían diagnóstico clínico de Deterioro Cognitivo Leve tenían más de 74 años y presentaban las siguientes características clínicas:

Tabla 8 Características clínicas de los sujetos con Deterioro Cognitivo Leve

Grupos de edad (número de sujetos)	>74 años (n=7)
Edad media (años)	80,5±5
Varones/mujeres	2/5
Fumador	0%
Bebedor	0%
Hipertensión arterial	28%
Dislipemia	28%
Síndrome ansioso/depresivo	28%
Disfunción tiroidea	14%

Los pacientes con Deterioro Cognitivo Leve fueron estudiados como un subgrupo diferente de los grupos de edad con el fin de buscar diferencias estadísticas en los parámetros del LCR de esta población con Deterioro Cognitivo Leve (DCL).

De esta forma, para el análisis comparativo y estadístico (ANOVA) del LCR los sujetos quedan clasificados en 5 grupos:

1. Sujetos Adultos Jóvenes de 18 a 49 años (n=12)
2. Sujetos Adultos de Mediana Edad de 50 a 64 años (n=17)
3. Sujetos Adultos con Envejecimiento Temprano (n=13)
4. Sujetos Adultos con Envejecimiento Avanzado Normal (n=12)
5. Sujetos Adultos con Deterioro Cognitivo Leve (n=7)

5.1.2 RESULTADOS DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN EL LCR PROCEDENTE DE LOS SUJETOS DE ENVEJECIMIENTO NORMAL AGRUPADOS POR EDAD O CON DETERIORO COGNITIVO LEVE.

Tabla 9 Composición general del LCR procedente de los sujetos participantes agrupados por edad o con DCL.

Grupo	Adultos Jóvenes	Adultos Mediana Edad	Envejecimiento Temprano	Envejecimiento Avanzado Normal	Envejecimiento con DCL
Edades (número de sujetos)	18-49 (n=12)	50-64 (n=17)	65-74 (n=13)	>74 (n=12)	>74 (n=7)
Proteínas totales (mg/dl)	16,5±2	16,4±2	15,3±1.9	18,2±1.3	18,8±1.8
Glucosa (mg/dl)	48,4±9	50,9±10	42,6±19	45,6±14	43,4±15
pH	7,2±0,1	7,2±0,2	7,3±0,1	7,3±0,1	7,2±0,05
Densidad	1,00059 ±0,0001	1,00058± 0,0001	1,00061± 0,0001	1,00061± 0,0001	1,00058± 0,0001
Leucocitos/μl	2,1±0,1	2,4±0,1	2,6±0,2	2,7±0,2	2,6±0,2

Media±EEM.

El estudio estadístico de la composición general del LCR en los 5 grupos de sujetos estudiados no reveló diferencias respecto al nivel de proteínas totales, glucosa total, pH, densidad, y leucocitos presentes por μl. Los datos están representado en la tabla anterior.

**5.1.3 RESULTADOS DE LOS NIVELES FACTORES NEUOTRÓFICOS EN EL LCR
PROCEDENTE DE LOS SUJETOS DE ENVEJECIMIENTO NORMAL AGRUPADOS
POR EDAD O CON DCL.**

Tabla 10 Niveles de GDNF, persefina, neurturina, TGF β_1 y TGF β_2 en el LCR procedente de los sujetos con envejecimiento normal agrupados por edad o con DCL

Grupo	Adultos Jóvenes	Adultos Mediana edad	Envejecimiento Temprano	Envejecimiento Avanzado	Envejecimiento con DCL
Edades (número de sujetos)	18-49 (n=12)	50-64 (n=17)	65-74 (n=13)	>74 (n=12)	>74 (n=7)
BDNF (pg/ml)	272,3 \pm 21	289,8 \pm 22	271,1 \pm 25	308,3 \pm 15	231,5 \pm 18 **
GDNF (pg/100μl)	75,8 \pm 5	76,2 \pm 4,6	83,3 \pm 18	72,4 \pm 13	71,2 \pm 3,3
Persefina (pg/100μl)	101,1 \pm 6,1	109,4 \pm 6,5	104,3 \pm 16	112,9 \pm 13	101,2 \pm 5,8
Neurturina	Nd	nd	nd	nd	nd
TGFβ_1 (pg/100 μg de proteína)	50,6 \pm 9	51,3 \pm 10	44,2 \pm 4	54,6 \pm 9	53,6 \pm 8
TGFβ_2 (pg/ml)	164,5 \pm 22	156,6 \pm 24	171,2 \pm 30	101,2 \pm 23	172,4 \pm 22

Media \pm EEM. ** p<0,001 respecto a los subgrupos de Jóvenes Adultos, Adultos de Mediana Edad, sujetos con E.Temprano y Sujetos con E. Avanzado.

Abrev.: BDNF, brain-derived neurotrophic factor

GDNF: Glial cell line derived neurotrophic factor

TGF β_1 : Transforming growth factor β_1

TGF β_2 : Transforming growth factor β nd: no detectable.

El análisis estadístico no reveló diferencias significativas respecto a **BDNF**, **GDNF**, **persefina**, **TGFβ₁** y **TGFβ₂** en el LCR de los sujetos de Envejecimiento Normal. La neurturina fue indetectable, probablemente porque sus niveles son inferiores al límite de detección del kit ELISA.

Sin embargo, se observó que el nivel de factor neurotrófico **BDNF** estaba reducido de modo significativo ($p < 0,001$, t-Student) en el LCR de sujetos de Envejecimiento con Deterioro Cognitivo Leve respecto a los otros subgrupos de edad incluyendo el subgrupo de sujetos con Envejecimiento Normal Avanzado, sin DCL.

Por tanto, el Envejecimiento Normal no se acompaña de cambios en LCR en los factores BDNF o de la familia GFL ni TGF. Sin embargo, en el Envejecimiento con Deterioro Cognitivo Leve se detecta un decremento de los niveles del factor neurotrófico BDNF en LCR.

La siguiente figura muestra los datos individuales de los niveles de BDNF en los sujetos estudiados con envejecimiento avanzado sin DCL y con envejecimiento con DCL.

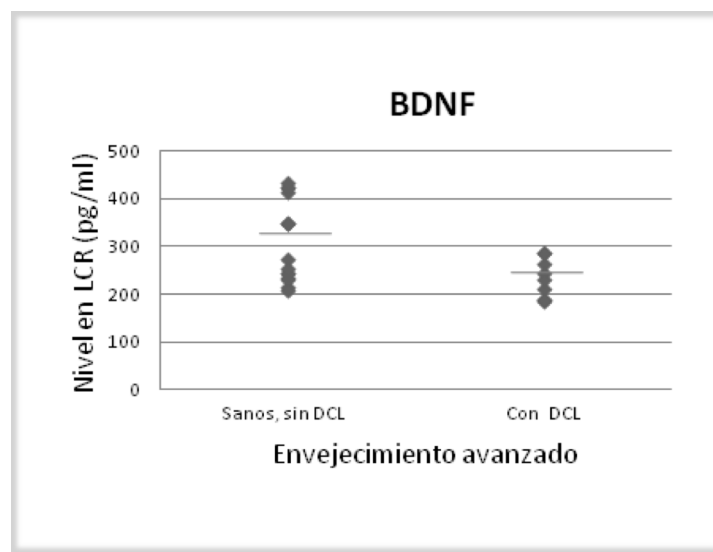


Figura 16 Valores individuales de BDNF en LCR procedente de los sujetos de Envejecimiento Normal Avanzado (mayores de 74 años de edad) o con Deterioro Cognitivo Leve.

La línea continua representa el valor medio de la población.

5.1.4 RESULTADOS DE ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN EL LCR PROCEDENTE DE LOS SUJETOS CON ENVEJECIMIENTO NORMAL AGRUPADOS POR EDAD O CON DCL.

Se cuantificó la actividad de las siguientes enzimas antioxidantes; glutatión-peroxidasa, glutatión-reductasa, catalasas, superóxido-dismutasas y peroxirredoxinas. Ello se observa en la siguiente tabla. También la glutatión-S-transferasa, que aportó diferencias significativas.

Tabla 11 Actividad de las enzimas antioxidantes glutatión-peroxidasa, glutatión-reductasa, catalasas, superóxido-dismutasas y peroxirredoxinas en el LCR procedente de los sujetos de Envejecimiento Normal agrupados por edad o con DCL.

GRUPOS de EDAD	18-49 años	50-64 años	65-74 años Envejecimiento Temprano	>74 años Envejecimiento Avanzado	>74 años DCL
GPX(mU/ml)	245,5±21	273,2±24	243,6±34	278,4±35	246,5±36
GR (mU/ml)	12,1±1,2	10,3±1,5	8,4±1	14,2±2	9,3±1.2
Catalasas (mU/ml)	2,2±0,6	1,8±0,5	2,3±0,9	2,7±1	1,5±0,6
SODs (U/ml)	0,17±0,1	0,18±0,1	0,15±0,1	0,14±0,2	0,14±0,1
PRDXs (ΔActrl - ΔA%)	0%	0%	1%	0%	0%

Media± EEM.

Abrev.: GPX, glutatión-peroxidasa; GR, glutatión-reductasa;
SODs, superóxido dismutasas; PRDXs, peroxirredoxinas;
ΔActrl - ΔA %, reducción porcentual de absorbancia respecto a control
(considerado 100%).

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas de la actividad enzimática antioxidante en LCR entre los distintos grupos de edad de sujetos adultos con Envejecimiento Normal, como se presenta en la anterior tabla. Tampoco se encontraron diferencias significativas con el grupo de sujetos de Envejecimiento asociado a Deterioro Cognitivo Leve.

Respecto a otra enzima antioxidante, la glutatión-S-transferasa (GST), se detectó que la actividad enzimática en LCR de la GST está reducida en los sujetos mayores de 74 años tanto si presentan Envejecimiento Normal como Envejecimiento asociado a DCL. EL ANOVA de una vía reveló que hay un efecto significativo del factor edad en la actividad de la GST ($F_{3,49}=2,8$; $p<0,05$), excluyendo el grupo de Envejecimiento Avanzado con DCL.

Se encontró que la actividad de la GST estaba reducida de modo significativo en el grupo de sujetos con Envejecimiento Avanzado Normal, mayores de 74 años, en comparación al resto de los grupos de edad ($p<0,01$; test de Newman-Keuls).

La actividad de GST en LCR también se encontró que estaba reducida de forma estadísticamente significativa en el grupo de sujetos con Envejecimiento asociado a DCL respecto a los grupos de sujetos adultos Jóvenes, adultos de Mediana Edad y sujetos con Envejecimiento Temprano ($p<0,05$, test de Student). No había diferencias significativas respecto al grupo de envejecimiento avanzado normal.

Finalmente, no se encontraron correlaciones significativas entre la edad en años y la actividad de la GST, mediante el test de Pearson. La figura siguiente muestra los datos de actividad de la Glutatión-S-Transferasa ($\mu\text{mol}/\text{min}$) en LCR en todos los grupos de edad estudiados.

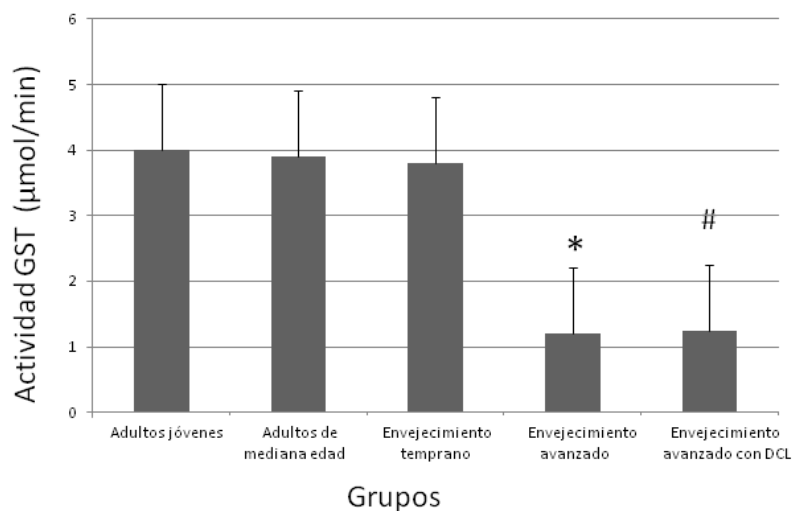


Figura 17 Actividad Glutación-S-Transferasa GST (μmol/min) en LCR procedente de los sujetos de Envejecimiento Normal agrupados por edad o con DCL..

Media ± EEM,

* $p < 0,05$ respecto a grupos de adultos jóvenes, adultos de mediana edad y envejecimiento temprano (test de Newman-Keuls).

$p < 0,05$ respecto a grupos de adultos jóvenes, adultos de mediana edad y envejecimiento temprano (test de Student).

Abrev.: LCR, líquido cefalorraquídeo;

GST, glutación-S-transferasa.

DCL, deterioro cognitivo leve.

Por tanto, el Envejecimiento Avanzado, o sea de sujetos mayores de 74 años, se acompaña de reducción significativa de la actividad glutación-S-transferasa en LCR, tanto en el Envejecimiento Normal como en el Envejecimiento asociado a Deterioro Cognitivo Leve.

En resumen, parece ser que el estado redox, en lo que respecta a una normal limpieza de ion superóxido y de agua oxigenada, no está alterado en el LCR durante la vejez normal. Ello se traduce en una adecuada defensa antioxidante en el envejecimiento. Los datos indican que hay una leve alteración del estado redox en los sujetos mayores de 74 años, que afecta a la actividad GST, pero no al resto de enzimas limpiadoras de ion superóxido (superóxido-dismutasas) o de agua oxigenada (catalasas, glutatión-peroxidasa, glutatión-reductasa, peroxirredoxinas).

5.1.5 RESULTADOS DEL CONTENIDO DE FERRITINA EN EL LCR Y DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE PAO DEL LCR PROCEDENTE DE LOS SUJETOS DE ENVEJECIMIENTO NORMAL AGRUPADOS POR EDAD O CON DCL.

El contenido en ferritina del LCR no mostró diferencias significativas entre los sujetos de Envejecimiento Normal en los distintos grupos de edad, incluido el grupo de Envejecimiento Avanzado Normal, tras el ANOVA de una vía. El contenido en ferritina del LCR también mostró valores normales en el grupo de sujetos con Envejecimiento con Deterioro Cognitivo Leve, como se observa en la siguiente tabla.

El potencial antioxidante del fluido, medido por el test PAO, tampoco mostró diferencias entre los sujetos de Envejecimiento Normal de los distintos grupos de edad, incluido los sujetos de los grupos de Envejecimiento Avanzado Normal. Sin embargo, el valor del test PAO se redujo de forma significativa en el LCR del grupo de sujetos con Envejecimiento con Deterioro Cognitivo Leve ($p < 0,05$ test de Student) respecto a los otros grupos de sujetos sin deterioro cognitivo, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 13 Contenido de Ferritina y potencial antioxidante en el LCR procedente de los sujetos de Envejecimiento Normal agrupados por edad o con DCL.

Grupo	Adultos jóvenes	Adultos mediana edad	Envejecimiento temprano	Envejecimiento avanzado	Envejecimiento avanzado con DCL
Edades	18-49	50-64 (n=17)	65-74	>74	>74
año(n)	(n=12)		(n=13)	(n=12)	(n=7)
Ferritina (ng/ml)	5,5±1.1	5,4±1.1	5,4±1	5,1±1,2	5,7±0,4
Test PAO (μmol/cl de Cu ⁺ formado)	12,78±1	12,26±1	12,21±1	12,62±1	10,45±1 *

Media ± EEM.

* p<0,05 respecto a adultos jóvenes, adultos de mediana edad, y envejecimiento avanzado normal (test de Student).

Abrev.:

DCL, deterioro cognitivo leve;

PAO, potencial antioxidante.

Los valores individuales del test de PAO en el LCR de sujetos mayores de 74 años se muestran en la siguiente figura, divididos en dos grupos de Envejecimiento Normal y el grupo de Envejecimiento con Deterioro Cognitivo Leve.

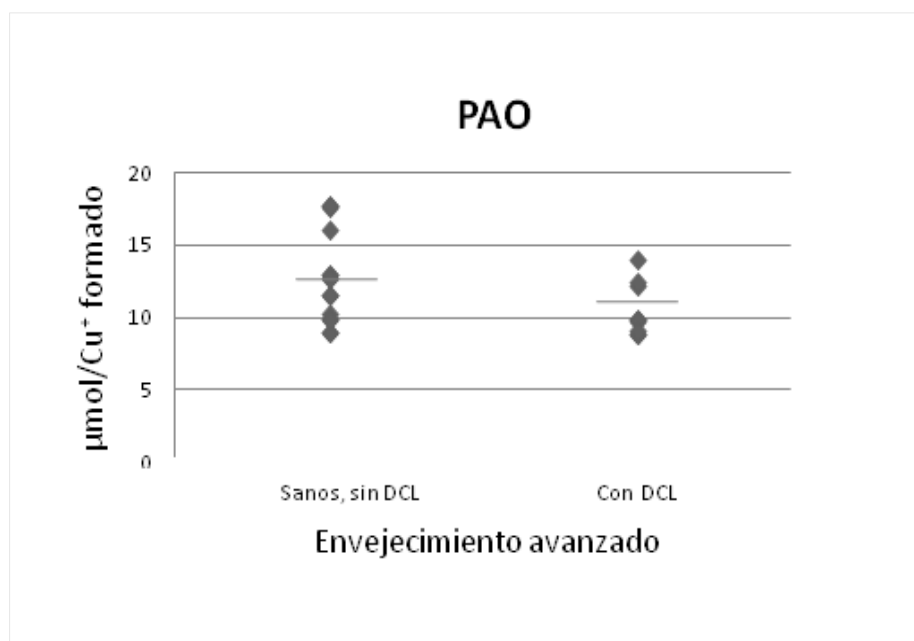


Figura 18 Valores individuales en LCR del test de PAO ($\mu\text{mol}/\text{cl}$ de Cu^+ formado) medido en sujetos con Envejecimiento Normal Avanzado, mayores de 74 años, o con Deterioro Cognitivo Leve. Las línea representa el valor medio de cada población

Abrev: DCL Deterioro cognitivo leve.

Por tanto, el Envejecimiento, tanto Normal como asociado a Deterioro Cognitivo Leve, no se acompaña de cambios en el contenido de ferritina del LCR.

El potencial antioxidante total del LCR, medida por el test PAO, no se altera con el Envejecimiento Normal, incluyendo el avanzado de mayores de 74 años, pero sí se reduce de forma significativa en el envejecimiento con Deterioro Cognitivo Leve.

5.2 RESULTADOS EN ENFERMEDAD DE PARKINSON .

5.2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y NEUROLÓGICAS DE LOS SUJETOS CON EP.

Se recogieron las principales características clínicas y edad de los dos grupos de sujetos:

- Sujetos con Enfermedad de Parkinson
- Sujetos control sin daño neurológico.

Todos los parámetros eran semejantes excepto la hipertensión, que era más frecuente en el grupo de pacientes con EP ($p<0.01$) respecto al grupo control, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 14 Características clínicas de sujetos con EP y sujetos sin daño neurológico o grupo control.

	EP (n=29)	CONTROLES (n=21)	P
Parámetros clínicos			
Edad (años)	63,5±0,9	67,9±10	NS
Sexo, varones n (%)	13 (45)	13 (62)	NS
Índice de masa corporal	24,1±4	24,5±3	NS
Hipertensión n (%)	13 (45)	5 (24)	<0.01
Dislipemia n (%)	7 (24)	4 (19)	NS
Enfermedad cardiovascular n (%)	4 (14)	4 (19)	NS
Aspirina n (%)	5 (17)	3 (14)	NS

Media±EEM.

Abrev.: EP, enfermedad de Parkinson

De los sujetos con EP se recogió el grado de Hoehn-Yahr en el que se encontraban, así como la duración de la enfermedad (años transcurridos desde el primer síntoma) y la puntuación del UPDRS III, IV y Total (*Unified Parkinson's disease rating scale*). También se recogieron datos relativos a la frecuencia de discinesias secundarias al tratamiento y los tratamientos con Levodopa, Rasagilina y Agonistas dopaminérgicos, como se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 15 Datos neurológicos de los sujetos con enfermedad de Parkinson (n=29)

Parámetro	EP
Grado medio Hoehn-Yahr	1,5±0,5
Duración de la EP (años)	7,7±1,2
UPDRS total	38,5±2,8
UPDRS III	28±2,4
UPDRS IV	0,8±0,2
Discinesias n (%)	5 (17)
Levodopa n (%)	14 (48)
Dosis levodopa (mg/día)	439±50
Rasagilina n (%)	22 (76)
Agonista dopaminérgico n (%)	18 (62)

Media±EEM. UPDRS, *Unified Parkinson's disease rating scale*;

5.2.2 RESULTADOS DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN EL LCR PROCEDENTE DE LOS SUJETOS CON EP.

Cuantificamos los niveles bioquímicos en LCR de proteínas, glucosa, pH, densidad y leucocitos de las muestras pertenecientes a los sujetos del grupo control y los pacientes con enfermedad de Parkinson, expresando sus valores medios, que no reveló diferencias entre los dos grupos, salvo una leucocitosis significativa en los sujetos con EP

Tabla 16 Composición general del LCR procedente de los sujetos con Enfermedad de Parkinson y sujetos control sin daño neurológico.

Parámetro del LCR	EP	Sujetos control
Proteínas totales (mg/dl)	19,6±2	18,3±1,9
Glucosa (mg/dl)	56,4±11	52,6±19
pH	7,4±0,3	7,3±0,1
Densidad	1,0009±0,0001	1,001±0,0001
Leucocitos (células/ μ l)	11,5±2 *	2,6±0,2

Media±EEM.

* $p < 0,01$ versus sujetos control (test de Student).

5.2.3 RESULTADOS DE LOS NIVELES DE FACTORES NEUROTROFICOS EN EL LCR PROCEDENTE DE LOS SUJETOS CON ENFERMEDAD DE PARKINSON.

Se cuantificaron los niveles en LCR de los ligandos de la familia GFL (GDNF, persefina y neurturina), todos ellos considerados factores neuroprotectores, y de BDNF. Se cuantificaron también los niveles de los ligandos de la familia TGF, $TGF\beta_1$ y $TGF\beta_2$, que se consideran factores neuroinflamatorios.

Las muestras de LCR procedentes de los sujetos con Enfermedad de Parkinson, se dividieron en dos grupos en función de la evaluación neurológica de la enfermedad, EP Temprana y EP Avanzada, expresando el valor medio de cada factor neurotrófico estudiado en cada grupo en picogramos por mililitro, realizándose el análisis comparativo con el ANOVA de una vía.

Tabla 17 Niveles medios de GDNF, persefina, neurturina, $TGF\beta_1$, $TGF\beta_2$ y BDNF en el LCR procedente de los sujetos con Enfermedad de Parkinson, agrupados en EP Temprana y EP Avanzada y de los sujetos control sin daño neurológico.

<u>Factores Tróficos</u>	EP Temprana	EP Avanzada	Sujetos control
GDNF	91,2±10,2	103,1±9,9	104,1±13
Persefina I	106,8±8,1	123,2±8,9	113,4±6,2
Neurturina	nd	nd	Nd
$TGF\beta_1$ de proteína	54,2±4 * #	63,9±3,7**	39,7±7
$TGF\beta_2$	182,8±33	176,6±34	177,2±25
BDNF	231,4±27,7	235,5±25,5	299,2±30

Media ± EEM.

* $p < 0,01$ versus controles

$p < 0,05$ versus pacientes con EP Avanzada

** $p < 0,001$ versus controles

Abrev.: EP, enfermedad de Parkinson

GDNF, glial cell line derived neurotrophic factor

$TGF\beta_1$, Transforming growth factor β_1

$TGF\beta_2$, Transforming growth factor β_2

BDNF, brain-derived neurotrophic factor;

nd, no detectable

- Los niveles de **GDNF**, **persefina** y **BDNF** en LCR no fueron diferentes entre los sujetos de los tres grupos.
- La **neurturina** fue indetectable en LCR, probablemente porque sus niveles están por debajo del umbral de detección del kit ELISA empleado.
- El Análisis de la Varianza de una vía (ANOVA) indicó un efecto de grupo significativo respecto al $TGF\beta_1$ ($F_2, 36=4,7$, $p<0,02$). Los valores en LCR de $TGF\beta_1$ estaban aumentados en pacientes en grado temprano y avanzado de la EP respecto a los sujetos control (EP temprana, $p<0,05$; EP avanzada, $p<0,01$, Newman-Keuls).
- Se detecta un aumento progresivo en LCR del valor de **$TGF\beta_1$** en los pacientes con EP siguiendo el curso de la enfermedad. Los valores de $TGF\beta_1$ en LCR de pacientes con EP Temprana fueron significativamente más bajos que los observados en el LCR de pacientes con EP Avanzada ($p<0,05$).
- Continuando con la correlación estadística entre los niveles de **$TGF\beta_1$** en LCR de los pacientes con EP y los parámetros clínicos de evolución neurológica, encontramos una correlación positiva entre los niveles de $TGF\beta_1$ en LCR y la Escala Motora UDPRS III ($r=0,55$, $p<0,001$, test de Pearson) como se muestra en la siguiente figura. Los valores de este factor en LCR aumentaron en los pacientes diagnosticados de EP durante el curso de la enfermedad

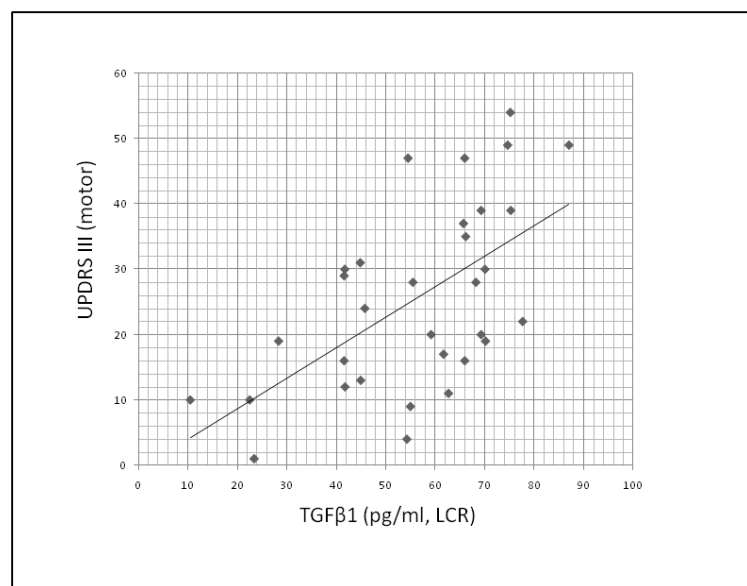


Fig. 19 Correlación entre los niveles de $TGF\beta_1$ en LCR (pg/ml) y la escala motora UDPRS III

- Finalmente, no se detectaron cambios en los niveles en LCR de **$TGF\beta_2$**

5.2.4 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN EL LCR PROCEDENTE DE LOS SUJETOS CON ENFERMEDAD DE PARKINSON.

Con el fin de evaluar el papel de enzimas antioxidantes en la EP, se midió la actividad en LCR de los pacientes con EP de glutatión-peroxidasa (GPX), glutatión-reductasa (GR), glutatión-S-transferasa (GST), catalasa, superóxido-dismutasas (SODs), y peroxirredoxinas (PRDxs). Se empleó ELISA o método HRP (Nelson y Parsonage, 2011).

Las muestras de LCR procedentes de los sujetos con Enfermedad de Parkinson, se dividieron en dos grupos en función de la evaluación neurológica de la enfermedad, EP Temprana y EP Avanzada, expresando el valor medio de actividad de cada enzima estudiada en en LCR en cada grupo. Las comparaciones fueron realizadas con el ANOVA de una vía seguido por el test de la T de Student's.

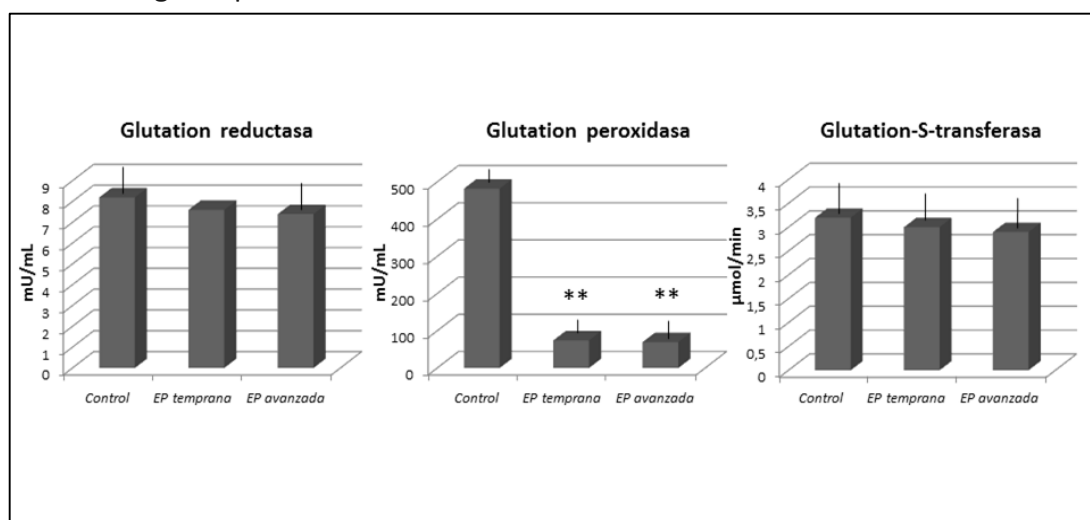


Fig. 20. Actividad media de las enzimas del sistema glutatión en miliunidades por mililitro o micromoles por minuto , glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión –S-transferasa (GST) en el LCR procedente de sujetos con Enfermedad de Parkinson, agrupados en EP Temprana o Avanzada, así como en sujetos control sin daño neurológico.

Media \pm EEM,

** $p < 0,01$ versus controles; test de Student

- Se detectó que la actividad en LCR de Glutación Peroxidasa (GPX) estaba significativamente reducida en los pacientes con Enfermedad de Parkinson, según ANOVA de una vía (efecto de grupo, $F_{2,36}=44.1$, $p<0.001$) en relación a los sujetos control.
- Los pacientes con enfermedad de Parkinson presentaban menores valores de actividad de GPX que los sujetos control con edad similar (EP temprana, $t=6,8$, $p<0,001$; EP avanzada, $t=6,8$, $p<0,001$; test de Student), como muestra la figura. La media porcentual de actividad de GPX estaba muy reducida en ambos grupos de pacientes (EP temprana, -84,6%; EP avanzada, -85,5%).
- No se observaron cambios significativos en el resto de enzimas del sistema glutatión estudiadas, o sea glutatión-reductasa y glutatión-S-transferasa. Respecto a la actividad de catalasa, se muestra la siguiente figura.

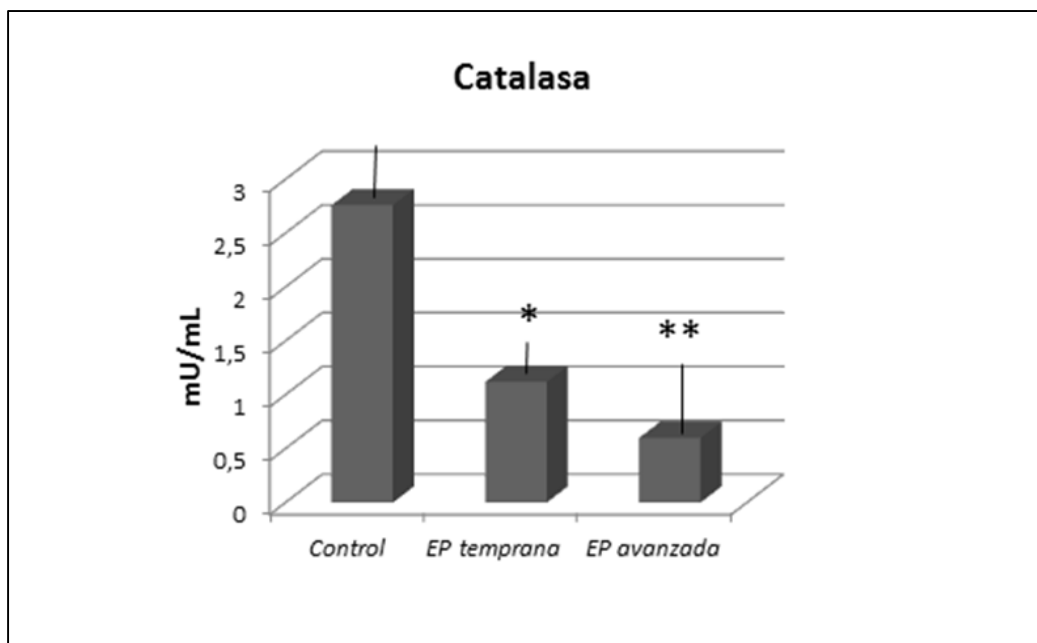


Fig. 21. Actividad enzimática media de Catalasa en LCR en miliunidades por mililitro, procedente de sujetos con Enfermedad de Parkinson, agrupados en EP Temprana o Avanzada, así como en sujetos control sin daño neurológico.

La actividad de catalasa en LCR de pacientes con EP también se encontró significativamente reducida en los grupos, como indicó el ANOVA de una vía (efecto de grupo, $F_{2, 36}=4,7$, $p<0,015$). Los pacientes de EP presentaban menos actividad catalasa que los sujetos control adultos (EP temprana, $t=2,1$, $p<0,05$; EP avanzada, $t=2,8$, $p<0,017$), como muestra la figura 20.

- La actividad media de catalasa estaba reducida en LCR un 59,4% y 78,2% en los pacientes con EP Temprana y con EP Avanzada respectivamente.

Respecto a la actividad de peroxirredoxinas, se muestra en la siguiente figura.

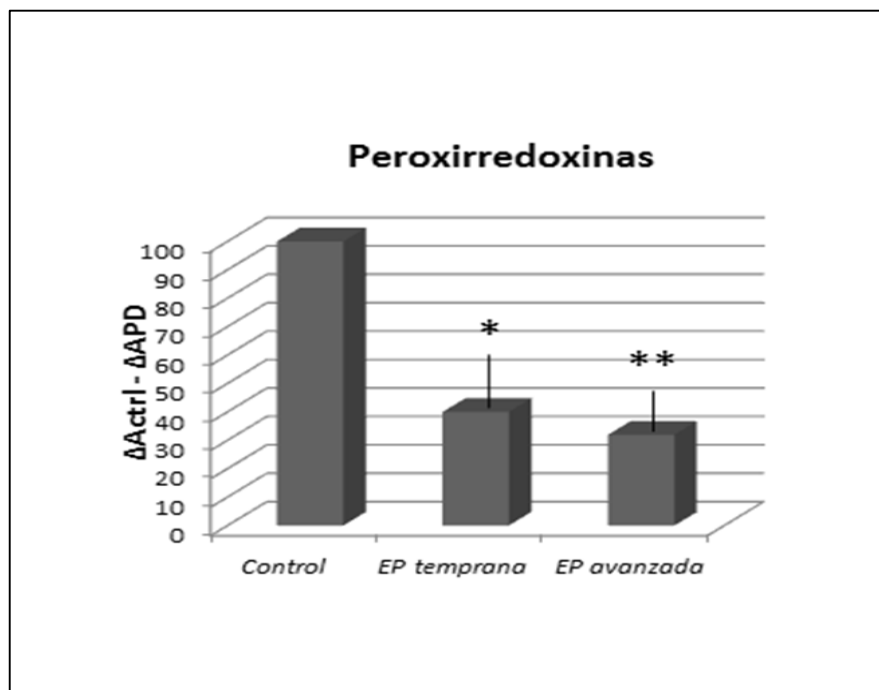


Fig. 22 Actividad enzimática media de Peroxiirredoxinas en LCR medido en porcentaje de reducción de la absorbancia, procedente de sujetos con Enfermedad de Parkinson, agrupados en EP Temprana o Avanzada, así como en sujetos Control sin daño neurológico.

Media \pm EEM, * $p<0,05$, ** $p<0,001$ versus controles; test de Student. Δ Actrl - Δ APD, reducción porcentual de absorbancia respecto a control (considerado 100%).

- La actividad de Peroxirredoxina PRDxs se observó que estaba también significativamente reducida en el LCR de los sujetos con EP (ANOVA de una vía, efecto de grupo, $F_{2, 36}=4,9$, $p<0,01$).
- La actividad en LCR de PRDxs se encontró reducida en los dos grupos de pacientes respecto con EP (EP temprana, $t=2,2$, $p<0,05$; EP avanzada, $t=2,7$, $p<0,01$) respecto al grupo de sujetos control.
- La actividad media de PRDxs en LCR estaba reducida un 60% y 68% en los pacientes con EP Tempranos y EP Avanzada, respectivamente.

Finalmente se valoró la actividad de superóxido dismutasa, como se observa en la figura siguiente.

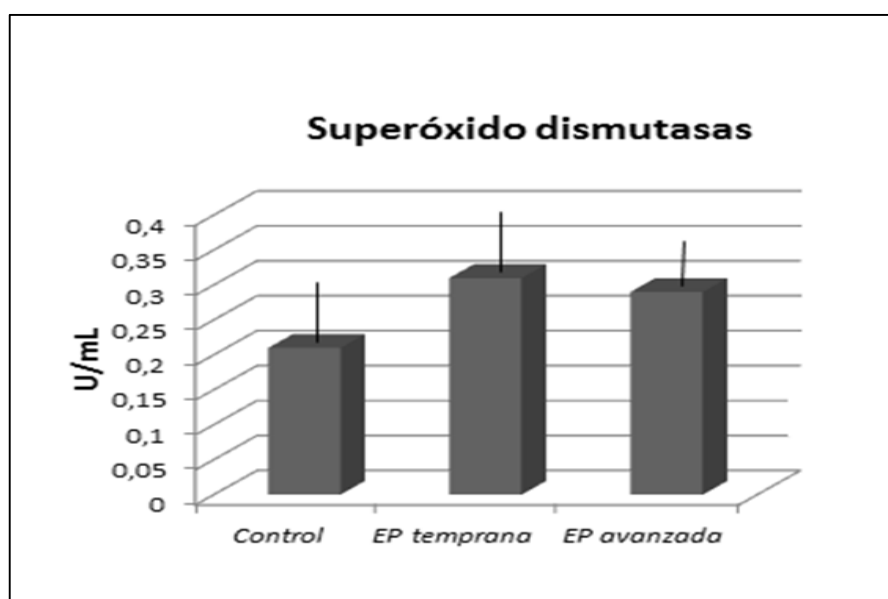


Fig. 23. Actividad enzimática media de Superoxidodismutasas en LCR en unidades por mililitro, procedente de sujetos con Enfermedad de Parkinson, agrupados en EP Temprana o Avanzada, así como en sujetos control sin daño neurológico.

Media \pm EEM.

- No se observaron cambios significativos en la actividad global de las enzimas superóxido-dismutasas o SODs, ni correlación con los parámetros clínicos de evolución neurológica.

En resumen, las principales enzimas antioxidantes “limpiadoras” de agua oxigenada están disminuidas en LCR de enfermos de Parkinson. Se observa un claro decremento de la actividad de las enzimas de “limpieza” de agua oxigenada, o sea **GPX, catalasas y PRDxs**, sin cambio en la actividad de las **superóxido-dismutasas**, que catalizan el ión superóxido. Ello indica un claro defecto en la “limpieza” de agua oxigenada, pero no de ión superóxido, reflejando la presencia de estrés peroxidativo en LCR de los pacientes.

No se detectaron correlaciones de alguna de las enzimas con los parámetros clínicos de los sujetos.

5.2.5 RESULTADOS DE CONTENIDO DE FERRITINA EN LCR PROCEDENTE DE LOS SUJETOS CON ENFERMEDAD DE PARKINSON.

Se cuantificó el contenido de ferritina, proteína fijadora de hierro, en LCR de sujetos con Enfermedad de Parkinson mediante ELISA, expresando su valor medio en cada grupo en micromoles por decilitro.

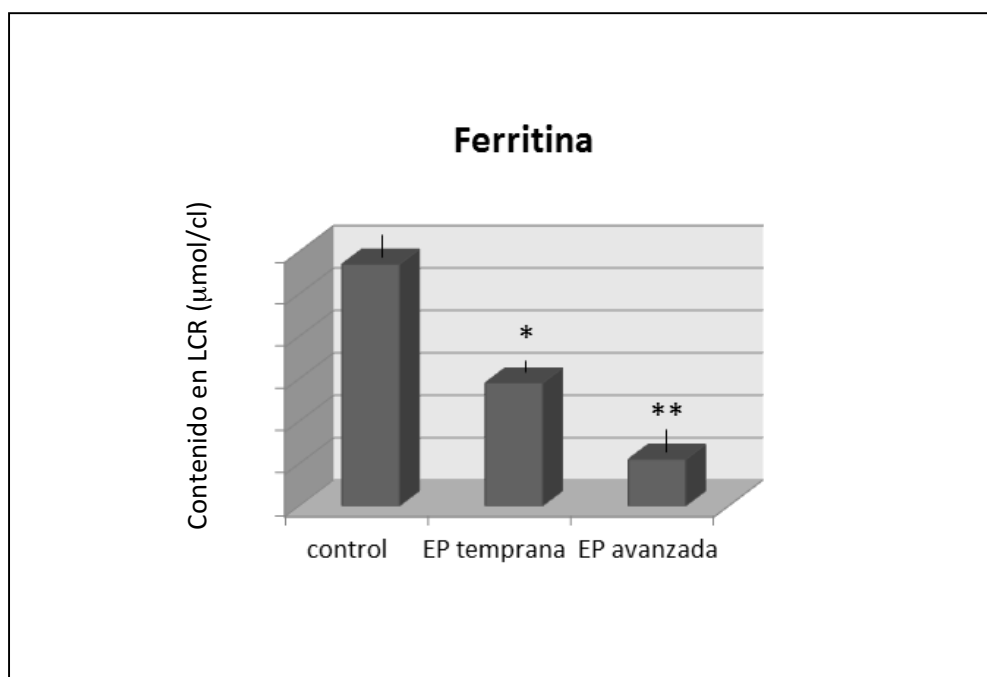


Fig.24. Contenido en Ferritina en LCR en micromoles por centilitro, en sujetos con Enfermedad de Parkinson Temprana o Avanzada, así como en sujetos control sin daño neurológico.

Las comparaciones se hicieron con ANOVA de una vía seguido del test de Student post-hoc

Media \pm EEM, * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ versus controles.

- Los niveles de ferritina estaban significativamente alterados en los distintos grupos, tal como indicó el ANOVA de una vía (efecto de grupo, $F_{2,36}=14,3$, $p < 0,001$).
- La ferritina del LCR estaba significativamente reducida en los pacientes con Enfermedad de Parkinson, tanto en el grupo de EP Temprana ($t=2,7$, $p < 0,013$, test de Student) como en los pacientes del grupo de EP Avanzada ($t=5,9$, $p < 0,001$) respecto a los sujetos control
- Los cambios se agravaron con el curso de la enfermedad, pues los niveles de ferritina se encontraron reducidos en un 49% en pacientes con EP temprana y en un 80,7% en pacientes con EP Avanzada.
- No se detectaron correlaciones con los parámetros clínicos, excepto respecto al índice de Hoehn-Yahr ($r=-0,51$, $p < 0,05$; test de Pearson), indicando que los niveles de ferritina disminuyen progresivamente con el aumento de la severidad de la EP medida por Hoehn-Yahr.

5.2.6 RESULTADOS DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE TOTAL DEL LCR PROCEDENTE DE LOS SUJETOS CON ENFERMEDAD DE PARKINSON

Se valoró la capacidad antioxidante del LCR mediante el test PAO en los sujetos con Enfermedad de Parkinson, y se agruparon los resultados en función de la evaluación neurológica de la enfermedad en EP Temprana o Avanzada expresando su valor medio en micromoles por litro.

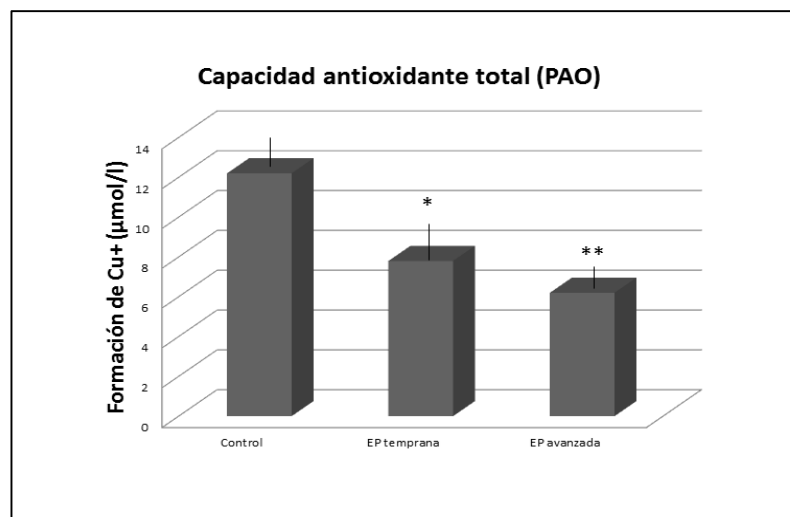


Fig. 54 Potencial Antioxidante Total (PAO) del LCR en micromoles por litro de cuproso reducido, en sujetos con Enfermedad de Parkinson Temprana o Avanzada, así como en sujetos control

Media \pm EEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus controles.

- Las comparaciones se hicieron con ANOVA de una vía seguido del test de Neuman-Keuls y de Student.
- Se detecta una disminución significativa en el LCR de todos los pacientes con EP respecto al LCR de sujetos control, y el test ANOVA de una vía detectó un efecto de grupo ($F_{2, 36} = 11,2$, $p < 0,01$). La capacidad antioxidante del fluido estaba significativamente reducida en los pacientes con EP Temprana ($t = 2,2$, $p < 0,05$, test de Student) y aún más en los pacientes con EP avanzada ($t = 2,9$, $p < 0,01$) respecto a al LCR de los sujetos control.

- Los cambios en la capacidad antioxidante total del LCR se agravaron con el curso de la enfermedad, pues los niveles medios se redujeron un 36% en pacientes con EP temprana y 49,2% en pacientes con EP Avanzada.

1.2.7 CUANTIFICACIÓN DEL ÍNDICE DE TIBBLING-LINK EN LOS SUJETOS CON ENFERMEDAD DE PARKINSON.

Se cuantificó el índice de Tibbling-Link para confirmar si el nivel de proteínas en LCR estaban o no influenciados por el nivel de niveles sanguíneos o si había posible daño de la barrera hematoencefálica.

El índice de albúmina en los sujetos con EP fue siempre inferior a 9, y no había diferencias significativas con los sujetos control (EP $7,2 \pm 0,5$; controles, $7,4 \pm 0,5$).

El índice de Tibbling-Link en el grupo de EP fue en todos los casos inferior a 0,7, y no había diferencias significativas con los sujetos control (EP $0,45 \pm 0,01$; controles, $0,42 \pm 0,01$).

Estos resultados confirman la ausencia de daño en la barrera hematoencefálica de los sujetos con Enfermedad de Parkinson que pudiera afectar a los niveles proteicos del LCR, confirmando datos previos del grupo de investigación (Fernández et al, 2013).

CAPITULO VI: DISCUSIÓN

La pérdida de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y la neuroinflamación son dos fenómenos que están asociados al envejecimiento cerebral. Es bien conocido que los cambios en factores neurotróficos y el estrés oxidativo pueden favorecer, al menos en parte, estos fenómenos asociados al envejecimiento (Barja, 2014; Budni et al., 2015).

La supervivencia de la población neuronal dopaminérgica es críticamente dependiente de los “factores dopaminotróficos” de la familia **GFL** y del **BDNF** (Scherman et al., 1989, Fearnley y Lees, 1991; Silbol et al., 2008; Budni et al., 2015). La familia GFL incluye ligandos del tipo de **GNDF, neurontina y persefina** (Fjord-Larsen et al., 2005). El **BDNF** es otro factor neurotrófico con importancia en el desarrollo y supervivencia de la población neuronal dopaminérgica de la sustancia negra (Moggi et al. 199). El BDNF, además de su efecto dopaminotrofico, es también crítico para el mantenimiento de otras poblaciones neuronales que intervienen en procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria (Korhonen et al., 1998; Albrecht et al., 2006).

La inflamación cerebral pudiera exacerbarse, al menos en parte, por los factores tróficos de la familia TGF, como **TGF β ₁** y **TGF β ₂**. Estos ligandos están relacionados con la activación de la microglía, y son considerados por algunos autores como proinflamatorios. **BDNF** está también relacionado con la neuroinflamación. Este factor puede ser liberado por la microglía activada, y esta liberación de BDNF puede a su vez, activar la microglía y favorecer la neuroinflamación (Zhang et al., 2014). Por consiguiente, algunos autores consideran que el BDNF actúa como una citoquina proinflamatoria. En consecuencia, BDNF parece tener un doble comportamiento: BDNF en exceso es proinflamatorio, pero el déficit de BDNF reduce su eficacia neurotrófica. De cualquier forma, el papel del BDNF en la neuroinflamación ha sido cuestionado recientemente por algunos autores que han atribuido efectos antiinflamatorios a niveles elevados de BDNF (Lai et al, 2018). Estos proponen que el BDNF es liberado por la microglía activada, pero su participación es mediadora entre los astrocitos y la microglía para regular acciones antiinflamatorias más bien que proinflamatorias. Los resultados de nuestro estudio, basado en el análisis en el LCR de estos ligandos, no muestran

cambios en los niveles de estos factores neurotróficos en el Envejecimiento Normal. La disminución de neuronas dopaminérgicas con la edad se estima en un 4-7% por década. (Scherman et al., 1989; Fearnally y Lees, 1991; Budni et al., 2015). Nuestros resultados indican que los factores neurotróficos de la **Familia GFL** no estarían implicados en esta disminución de la población neuronal dopaminérgica. Además, no hemos encontrado modificado los niveles de **BDNF**, otro factor dopaminotrófico, en el grupo de sujetos de Envejecimiento Normal. Estos datos sugieren que el déficit de neuronas dopaminérgicas que se observa con la edad no está vinculado a cambios en el LCR de las factores neurotróficos de la familia GFL o al BDNF. Diversos autores afirman que el aumento de BDNF es neuroinflamatorio, al ser liberado por la microglía, la cual se sabe que se activa con la edad avanzada. De este modo una mayor reactividad de la microglía con el envejecimiento se acompañaría de aumento de BDNF (Salehi y Mashayekhi, 2009). Sin embargo, según nuestros datos no hay cambios en los niveles de BDNF en el LCR en el envejecimiento, incluso avanzado. Este hecho está de acuerdo por otra parte con otros autores, como Mogi et al (1999).

Sin embargo, es importante resaltar, que el LCR de los sujetos con Deterioro Cognitivo Leve muestra niveles reducidos de **BDNF**. Es conocido el papel crítico de este factor neurotrófico en el mantenimiento de neuronas que median en procesos cognitivos, además de su acción sobre neuronas dopaminérgicas (Silhol et al., 2008; Korhonen et al., 1998; Albrecht et al., 2006). El déficit de BDNF ya ha sido propuesto como acelerador de la debilitación de procesos cognitivos como la memoria y el aprendizaje (Silhol et al., 2008; Korhonen et al., 1998; Albrecht et al., 2006) y los resultados de nuestro estudio podrían corroborar este papel del BDNF. Por otro lado, los niveles en LCR de nuestro estudio no han presentado alteración de los ligandos de la familia GFL, GDNF, Persefina y Neurturina en los sujetos con DCL. En este contexto, otros autores han publicado que el GDNF en LCR de pacientes con Enfermedad de Alzheimer se han encontrado elevados (Straten et al, 2009) o disminuidos (Blasko et al., 2006). Hay que comentar que diversos autores indican que este factor neurotrófico protege a las neuronas del daño causado por infecciones o traumas, y facilita la plasticidad sináptica hipocámpica, y dado su decremento parece estar asociado al declive cognitivo que aparece en la vejez (Patterson, 2014; Petzold et al, 2015),

La Enfermedad de Parkinson Idiopática se ha relacionado con un soporte neurotrófico inadecuado (Mogi et al, 1999; Murer et al, 2001; Akerud et al. 2002; Airaksinen y Saarma 2002). Nuestro trabajo indica que, al menos, los factores tróficos **GNDF, persefina y BDNF** no se ven alterados en el LCR de enfermos de Parkinson estudiados. Estos factores se consideran neuroprotectores de neuronas catecolaminérgicas (Lin et al. 1993; Krieglestein et al. 1998a, 1998b; Altar et al, 1992; Sauer et al, 1993; Nishimura et al, 2005). Los resultados de nuestro trabajo sugieren que la EP no se asocia a un soporte neurotrófico alterado, al menos en lo que respecta a los factores de la familia GFL y BDNF.

Respecto al **GNDF**, el factor más estudiado de la familia GFL, los resultados concuerdan con diversos autores que afirman que el contenido de GDNF de las regiones nigroestriatales y la expresión de sus receptores cRet y GRF α 1 no se alteran en los pacientes de EP (Bäckman et al, 2006). Los factores de la **familia GFL** ejercen efectos neuroprotectores en modelos animales de EP, lo que ha generado esperanzas de su uso terapéutico (Batchelor et al. 2000; Airaksinen y Saarma 2002; Salvatore et al. 2004; Airaksinen et al, 2002; McNaught et al, 2002; Allen et al, 2013). Sin embargo, dicho uso se ve muy limitado por la escasa difusibilidad de estos factores en tejido cerebral (Nutt et al, 2003; Lang et al, 2006; Boado y Pardridge, 2009; d'Anglemon de Tassigny et al, 2015).

Respecto al **BDNF**, su expresión nigrica se reduce en pacientes de EP (Mogi et al, 1999; Murer et al, 2001), pero también se ha detectado aumento en LCR de enfermos (Salehi y Mashayekhi, 2009). Sin embargo, nuestros datos indican que el factor BDNF no está alterados en LCR en la EP.

Con respecto a la inflamación cerebral, los niveles en LCR de **TGF β ₁ y TGF β ₂** no han aparecido alterados ni en los sujetos de Envejecimiento Normal, ni en los sujetos con Deterioro Cognitivo Leve. Ambos factores liberados por la microglía activada han sido relacionados con procesos inflamatorios y enfermedades neurodegenerativas (Zettenberg et al., 2004; Hirsch and Hunot, 2009; Hirsch et al, 2014). Niveles elevados de **BDNF**, que también se han relacionado con proinflamación (Zhang et al., 2014), no se han visto modificados en nuestro estudio. Por consiguiente, si hay un proceso

inflamación en el SNC en el envejecimiento, este podría no estar asociado a cambios en los factores de la familia TGF ni a BDNF, lo que no concuerda con el concepto actual de “inflammaging” (Hardeland et al, 2015). Sin embargo, hay que recordar que otros autores han detectado aumento de otro tipo de factores inflamatorios con la edad, que no han sido abordados en este trabajo (Godbout y Johnson, 2004; Campuzano et al, 2009; Ritzel et al, 2015).

Entre todos los factores estudiados en el LCR de los pacientes con Enfermedad de Parkinson, solo el factor **TGF β ₁**, se encontró aumentado. Diversos autores ya han detectado aumento de TGF β ₁ en el LCR de pacientes de Parkinson (Mogi et al, 1995; Vawter et al, 1996), así como en la sustancia negra de los pacientes de EP (Hirsch et al, 2012). Este factor se considera neuroinflamatorio, y por tanto su incremento se podría relacionar con el proceso inflamatorio subyacente del SNC en la EP (Wyss-Coray et al. 2001; Hirsch y Hunot, 2009). De hecho, este factor es liberado por la microglía y parece que exacerba la neuroinflamación (Hirsch y Hunot 2009; Hirsch et al. 2012). Además, el aumento de **TGF β ₁** se correlacionó con el nivel evolutivo de la EP, siendo mas marcado en los sujetos con EP avanzada., es decir, los que llevaban mas tiempo con síntomas y en un estadio sintomatológico neurológico superior. También los resultados mostraron correlación positiva entre el nivel de **TGF β ₁** en el LCR de los pacientes de Parkinson y su afectación motora. Se encuentra elevado en estadios iniciales de la EP, aumentando su nivel con la progresión de la enfermedad. Todos estos resultados concuerdan con la ya discutida teoría de neuroinflamación como factor patogénico de la EP, donde la hiperreactividad microglial juega un papel clave.

Nuestro estudio también sugiere que la eficacia antioxidante del LCR parece estar solo ligeramente afectada en el Envejecimiento Normal. El estado oxidativo del LCR se mantuvo normal, evaluado por la actividad limpiadora del anión superóxido y peróxido de hidrogeno, GST, niveles de ferritina y el potencial antioxidante del fluido. Nuestros resultados están en desacuerdo con la teoría de que el proceso de envejecimiento está asociado a un nivel mas alto de estrés oxidativo que en edades más tempranas (Ji, 2001; Miles et al., 2004), o con un incremento de la actividad de SOD en el LCR (Hiramatsu et al., 1992).

Tan solo en los sujetos mas envejecidos de Envejecimiento Normal, el grupo de Envejecimiento Avanzado, mayores de 74 años, los resultados revelaron una disminución de la actividad de la enzima antioxidante GST y no de los otros factores antioxidantes incluidos en el estudio.

Las glutatión-S-transferasas son enzimas ubicuas que pertenecen a la familia del glutatión o GSH, familia que actualmente se denomina “Sistema de Defensa antioxidante y detoxificante GSH”. La función general es unir el GSH a centros electrofílicos de diversas moléculas tóxicas, para que aumente su solubilidad y sean fácilmente excretables por el organismo (Mazzetti et al, 2015). Existen descritas cuatro grandes subfamilias de GST: citosólica, mitocondrial, membranaria y resistente a fosfomicina. La más estudiada, y que afecta a nuestro trabajo, es la familia citosólica, que posee siete clases de GST: alfa, mu, pi, teta, sigma, zeta y omega. En cerebro y LCR las más abundantes son las mu, pi y alfa, localizadas en los astrocitos y las neuronas (Smeyne et al, 2007). Nuestro estudio se refiere a la actividad GST en LCR, sin diferenciar las distintas clases (propuesta de futuros trabajos de investigación en relación al estudio de otras subfamilias). Las enzimas GST realizan numerosas funciones antioxidantes a nivel cerebral eliminando diversos xenobióticos con carácter oxidante: xenobióticos endógenos, como quinonas derivadas de la dopamina, hidroperóxidos y peróxidos lipídicos como el 4-hidroxinonenal (Hayes et al, 2005; Singhal et al, 2015); fármacos xenobióticos como psicofármacos, inhibidores de la colinesterasa, y antiinflamatorios; xenobióticos exógenos como pesticidas, insecticidas y carcinógenos (Board and Menon, 2013). Además, participan en importantes funciones antiinflamatorias, entre las que destacan la síntesis de esteroides antiinflamatorios (derivados de androstendiona y pregnenolona) y de prostaglandinas (Board et al, 2013), la regulación de la función TNF-alfa (Wu et al, 2006) y la activación de macrófagos desactivados por óxido nítrico (Malik et al, 2012). Estos hallazgos nos permiten proponer que el Envejecimiento Avanzado podría estar asociado con una reducción en la eficacia detoxificadora mediada por la GST.

El análisis del LCR en los sujetos con Deterioro Cognitivo Leve ha revelado, aparte del ya discutido déficit del factor neurotrófico BDNF, encontramos la presencia de mas

alteraciones oxidativas que en los sujetos con Envejecimiento Normal. Tanto el potencial antioxidante del fluido, medido a través del PAO test, como la actividad de la enzima antioxidante GST fueron encontrados reducidos. En este contexto, la memoria y el déficit cognitivo relacionados con la edad ya han sido asociados a nivel cerebral y en plasma con déficit de niveles antioxidantes e incremento de niveles de estrés (Akbaraly et al., 2007. Rinaldi et al., 2003. Torres et al. 2011). Un eficiente sistema antioxidante puede preservar la función cognitiva en el envejecimiento (Akbaraly et al., 2007, Rodrigues Siqueira et al., 2005) y a tenor de nuestros resultados parece que este sistema antioxidante está afectado en sujetos de envejecimiento avanzado con Deterioro Cognitivo Leve.

En cuanto al potencial antioxidante del LCR, el test de PAO representa la capacidad de la muestra de LCR para reducir iones de cobre de su forma cúprica a cuprosa. Una disminución de la capacidad de reducir iones cúpricos podría facilitar cambios en los principales elementos de defensa frente a la oxidación en el plasma (vitamina C, vitamina E, bilirrubina, ácido úrico y glutatión). Respecto a la reducción específica de la actividad de GST, este defecto enzimático también reduciría la eficacia detoxificadora en el envejecimiento con DCL, como se ha discutido anteriormente. En este contexto, es sabido que la actividad de la GST en LCR está disminuida en los pacientes con Enfermedad de Alzheimer, en los cuales las defensas antioxidantes se encuentran fuertemente afectadas (Lovell et al., 1998, Markesbery and Carney, 1999; Kimpara et al., 2000; Torres et al., 2011).

En el análisis en LCR de parámetros básicos como niveles de proteínas totales, contenido de glucosa, densidad, pH o conteo de leucocitos no se han encontrado modificaciones en los sujetos de Envejecimiento Normal ni tampoco en el de sujetos con Deterioro Cognitivo Leve, revelando que la bioquímica básica del LCR no se encuentra alterada durante el Envejecimiento.

El estrés oxidativo, es conocido, parece ser una de las causas más probables de la neurodegeneración y se ha definido como un desbalance entre la producción de especies reactivas oxidantes y los mecanismos antioxidantes (Jenner, 2003). El estrés oxidativo se detecta en sangre, tejido nervioso y LCR de los pacientes de EP. En el LCR en concreto,

las defensas antioxidantes parece que están seriamente comprometidas en los enfermos porque los niveles de importantes enzimas antioxidantes como la glutatión-S-transferasa (GST), la ferroxidasa ceruloplasmina y la peroxidasa DJ-1 o PARK7 están reducidos (Maarouf et al, 2012). Sin embargo, hay resultados negativos o contradictorios acerca del nivel/actividad en LCR de las principales enzimas antioxidantes, bien de las “limpiadoras” de iones superóxido o superóxido-dismutasas, o de las “limpiadoras” de agua oxigenada, o sea la glutatión-peroxidasa, catalasa y peroxirredoxinas (Maarouf et al, 2012).

Nuestros resultados respecto a las defensas antioxidantes en LCR de los pacientes con Enfermedad de Parkinson se observó un claro decremento de la actividad de las enzimas de “limpieza” de agua oxigenada, o sea **GPX, catalasas y PRDxs**, sin cambio en la actividad de las **superóxido-dismutasas**, que catalizan el ion superóxido. Ello indica un claro defecto en la “limpieza” de agua oxigenada, pero no de ión superóxido, reflejando la presencia de estrés peroxidativo. Los datos enzimáticos del sistema glutatión indican que la limpieza de agua oxigenada mediada por dicho sistema está afectada, pues la enzima peroxidasa principal de dicho sistema, o sea la glutatión peroxidasa, presenta una clara disminución en su actividad. La hipoactividad de la enzima “de entrada” del sistema glutatión, de catalasa y de las peroxirredoxinas, todas enzimas “limpiadoras” de agua oxigenada, indican la presencia de estrés peroxidativo con acúmulo de agua oxigenada en los pacientes con EP.

En síntesis, nuestros resultados indican que, tras analizar la actividad de las enzimas de “limpieza” de ion superóxido y agua oxigenada, existe un claro déficit de peroxidasas de agua oxigenada sin cambios en la actividad superóxido-dismutasa. La GPX es una selenioproteína que reduce peróxidos a agua, así como también hidroxiperóxidos a sus alcoholes correspondientes. Las catalasas son enzimas presentes en todo el organismo y que descomponen el agua oxigenada. Las peroxirredoxinas son peroxidasas ubicuas dependientes de cisteínas que también reaccionan con el agua oxigenada y sustratos hidroperóxidos.

Respecto a la ferritina, otro importante factor antioxidante, los resultados sobre los pacientes con enfermedad de Parkinson reflejan un contenido de **ferritina** claramente disminuido en el LCR de los pacientes con EP, siendo este déficit aun mas marcado con

el curso avanzado de la enfermedad. La ferritina es la enzima que fija hierro sobre todo a nivel lisosomal (Navarro-Yepes et al, 2014), y se calcula que fija un tercio del hierro total (Bradbury, 1997). El déficit de ferritina causa un aumento citosólico de hierro libre en forma ferrosa Fe(II), procedente principalmente de los depósitos lisosomales alterados (Navarro-Yepes et al, 2014). Este hierro ferroso se convierte en hierro férrico o Fe(III) que facilita la reacción de Fenton, donde el hierro se combina con peróxido de hidrógeno dando lugar a radicales hidroxilos citotóxicos. La reacción de Fenton se ve incrementada si hay estrés peroxidativo, menor ferritina y más cantidad de hierro de origen lisosomal, como es el caso en la EP (Dexter et al, 1990; Kuiper et al, 1994; Double et al, 2000; Sian-Hulsmann et al, 2011). Nuestros resultados concuerdan con los de otros autores que han descrito menores niveles de ferritina en LCR en la EP (Dexter et al, 1990).

Todos estos hechos oxidativos se han relacionado también con una menor **capacidad antioxidante global** del sistema nervioso en la enfermedad de Parkinson (Jenner, 2003; Van Dijk, 2010). Nuestros resultados sobre la capacidad antioxidante total del LCR en los pacientes con EP, medido por el test de PAO, presentaron una disminución progresiva que se muestra mas marcada con el avance de la enfermedad de forma semejante a los discutidos niveles de ferritina y de la actividad enzimática de las peroxidasas “limpiadoras” de agua oxigenada. Estos resultados de datos enzimáticos y de ferritina indican una grave alteración del homeostasis redox en los pacientes de EP, con presencia de estrés peroxidativo por déficit de limpieza de peróxido de hidrógeno e inadecuado metabolismo del hierro.

El análisis en LCR de parámetros bioquímicos básicos como niveles de proteínas totales, contenido de glucosa, densidad, pH no se han encontrado alterados en los pacientes con Enfermedad de Parkinson, revelando que la bioquímica general del LCR no se encuentra alterada en el LCR en la EP. Tan solo se detectó un contaje de leucocitos en el rango de leucocitosis en el LCR de pacientes con EP, lo que parece estar relacionado con el estado neuroinflamatorio de la EP. Sin embargo, la evaluación de la barrera hematoencefalica con el Índice de Tibbling-Link no muestra resultados patológicos, descartando la inflamación de la BHE en los pacientes con Enfermedad de Parkinson.

CAPÍTULO VII-CONCLUSIONES

- I. Existe un adecuado soporte neurotrófico y estado redox en el LCR durante el Envejecimiento Normal, y sólo en los sujetos de mayor edad se afecta ligeramente la eficacia antioxidante.
 - No hay cambios en líquido cefalorraquídeo de los factores dopaminotróficos que mantienen la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, ni de los factores proinflamatorios de la familia TGF.
 - Solo los sujetos mayores de 74 años, presentan actividad reducida de la enzima antioxidante glutatión-S-transferasa.
- II. En el Envejecimiento con Deterioro Cognitivo Leve el líquido cefalorraquídeo muestra mayores cambios oxidativos y tróficos que el Envejecimiento Normal:
 - Potencial antioxidante reducido, actividad reducida de la enzima antioxidante glutatión-S-transferasa y niveles reducidos de BDNF.
- III. En los sujetos con Enfermedad de Parkinson, el análisis del líquido cefalorraquídeo no revela déficit de soporte neurotrófico respecto a los ligandos neuroprotectores de la familia GFL y BDNF. Sólo refleja aumento en los niveles del neurofactor proinflamatorio $TGF\beta_1$, que además está correlacionado de forma positiva con el tiempo de evolución de la enfermedad, estadio neurosintomatológico y con el grado de afectación motora.
- IV. En los sujetos con Enfermedad de Parkinson, el líquido cefalorraquídeo refleja una seria alteración en el estado redox, con presencia de estrés peroxidativo, caracterizado por una deficitaria capacidad de eliminación de agua oxigenada así como inadecuado depósito de hierro.
 - Marcado déficit en la actividad enzimática de glutatión peroxidasa, catalasa, y peroxirredoxinas, sin cambios en la actividad de superoxidodismutasas.
 - Disminución del contenido en ferritina y de la capacidad antioxidante total del fluido de modo progresivo al curso evolutivo de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

Abdi F, Quinn JF, Jankovic J, McIntosh M, Leverenz JB, Peskind E, Nixon R, Nutt J, Chung K, Zabetian C, Samii A, Lin M, Hattan S, Pan C, Wang Y, Jin J, Zhu D, Li GJ, Liu Y, Waichunas D, Montine TJ, Zhang J. Detection of biomarkers with a multiplex quantitative proteomic platform in cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative disorders. *J Alzheimers Dis.* 2006; 9(3):293-348.

Adamczuk K, Schaefferbeke J, Vanderstichele HM, Lilja J, Nelissen N, Vandenberghe R.. Diagnostic value of cerebrospinal fluid A β ratios in preclinical Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 2015; 7(1), 75.

Afanasyev I. Signaling and damaging functions of free radicals in aging-free radical theory, hormesis and TOR. *Aging Dis.* 2010; 1:75-88.

Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signaling, biological functions and therapeutic value. *Nature Rev Neurosci.* 2002; 3:383-394.

Akerud P, Holm PC, Castelo-Branco G, Sousa K, Rodriguez FJ, Arenas E. Persephin-overexpressing neural stem cells regulate the function of nigral dopaminergic neurons and prevent their degeneration in a model of Parkinson's disease. *Mol Cell Neurosci* 2002; 21: 205-222.

Albrecht D, García L, Cartier L, Kettlun AM, Vergara C, Collados L, Valenzuela MA. Trophic factors in cerebrospinal fluid and spinal cord of patients with tropical spastic paraparesis, HIV, and Creutzfeldt-Jakob disease. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2006; 22(3):248-54.

Alkarabally NT, Faure H, Gourlet V, Favier A, Bert C.. Plasma carotenoid levels and cognitive performance in an elderly population results of EVA study. *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2007; 62 (3) 308-316.

Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther.* 2013; 138(2):155-75.

Altar CA, Boylan CB, Jackson C, Hershenson S, Miller J, Wiegand SJ, Lindsay RM, Hyman C. Brain-derived neurotrophic factor augments rotational behavior and nigrostriatal dopamine turnover in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(23):11347-51.

Anandhan A, Rodriguez-Rocha H, Bohovych I, Griggs AM, Zavala-Flores L, Reyes-Reyes EM, Seravalli J, Stanciu LA, Lee J, Rochet J, Khalimonchuk O, Franco R. Overexpression of alpha-synuclein at non-toxic levels increases dopaminergic cell death induced by copper exposure via modulation of protein degradation pathways. *Neurobiol Dis* 2014; pii: S0969-9961(14)00364-7. doi: 10.1016/j.nbd. 2014; 11.018.

Arlt S, Finckh B, Beisiegel U, Kontush A. Time-course of oxidation of lipids in human cerebrospinal fluid in vitro. *Free Radic Res* 2000; 32(2):103-14.

Bäckman CM, Shan L, Zhang YJ, Hoffer BJ, Leonard S, Troncoso JC, Vonsattel P, Tomac AC. Gene expression patterns for GDNF and its receptors in human putamen affected by Parkinson's disease: A real-time PCR study. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 252:160-166.

Barja G. The mitochondrial free radical theory of aging. *Prog. Mol. Biol. Transl. SCI.* 2014; 127, 1-7.

Batchelor PE, Liberatore GT, Porritt M, Donnan GA, Howells DW. Inhibition of brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor expression reduces dopaminergic sprouting in the injured striatum. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 3462–3468.

Bauer JH, Goupil S, Garber GB, Helfand SL. An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(35):12980-5.

Beach TG, Walker DG, Sue LI, Newell A, Adler CC, Joyce JN. Substantia nigra Marinesco bodies are associated with decreased striatal expression of dopaminergic markers. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63(4):329-37.

Bennett DA, Beckett LA, Murray AM, Shannon KM, Goetz CG, Pilgrim DM, Evans DA. Prevalence of parkinsonian signs and associated mortality in a community population of older people. *N Engl J Med* 1996; 334(2):71-6.

Biju KC, Santacruz RA, Chen C, Zhou Q, Yao J, Rohrabough SL, Clark RA, Roberts JL, Phillips KA, Imam SZ, Li S. Bone marrow-derived microglia-based neurturin delivery protects against dopaminergic neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2013; 535:24-29.

Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework, *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 89-95.

Bjorksten J. The crosslinkage theory of aging. *J Am Geriatr Soc* 1968; 16: 408-427.

Bjorksten J, Tenhu H. The crosslinking theory of aging - added evidence. *Exp Gerontol* 1990; 25: 91-95.

Blasko I, Ledere W, Oberbauer H, Walch T, Kemmler G, Hinterhuber H, Marksteiner J, Humpel C.. Measurement of thirteen biological markers in CSF of patients with Alzheimer's disease and other dementias. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2006; 21 (1), 9-15.

Bloch A, Probst A, Bissig H, Adams H, Tolnay M, Alpha-synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects, *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006; 32(3), 284-295.

Boado RJ, Pardridge WM. Comparison of blood-brain barrier transport of glial-derived neurotrophic factor (GDNF) and an IgG-GDNF fusion protein in the rhesus monkey. *Drug Metab Dispos* 2009; 37(12):2299-2304.

Board PG, Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim Biophys. Acta* 2013; 1830(5):3267-3288.

Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24(2):197-211.

Braak H, Del Tredici K, Bratzke H, Hamm-Clement J, Sandmann-Keil D, Rüb U. Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J Neurol.* 2002; 249 Suppl 3: III/1-5.

Bradbury MW. Transport of iron in the blood-brain-cerebrospinal fluid system. *J Neurochem.* 1997; 69(2):443-454.

Brys K, Vanfleteren JR, Braeckman BP. Testing the rate of living/oxidative damage theory of aging in the nematode model *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol* 2007; 42: 845-851.

Budni J, belletini-Santos T, Mina F, Garcez MI, Zugno AI.. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging Dis.* 2015; 6 (5), 331-341.

Buhmann C, Arlt S, Kontush A, Möller-Bertram T, Sperber S, Oechsner M, Stuerenburg HJ, Beisiegel U. Plasma and CSF markers of oxidative stress are increased in Parkinson's disease and influenced by antiparkinsonian medication. *Neurobiol Dis* 2004; 15(1):160-170.

Bürger née Buch K, Padberg F, Nolde T, Teipel SJ, Stübner S, Haslinger A, Schwarz MJ, Sunderland T, Arai H, Rapoport SI, Möller HJ, Hampel H. Cerebrospinal fluid tau protein shows a better discrimination in young old (<70 years) than in old old patients with Alzheimer's disease compared with controls. *Neurosci Lett* 1999; 277(1):21-24.

Burguillos MA, Deierborg T, Kavanagh E, Persson A, Hajji N, Garcia-Quintanilla A, Cano J, Brundin P, Englund E, Venero JL, Joseph B. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature* 2011; 472(7343):319-324.

Calne DB, Langston JW. Aetiology of Parkinson's disease. *Lancet*. 1983; 24-31; 2(8365-66):1457-1459.

Campuzano O, Castillo-Ruiz MM, Acarin L, Castellano B, Gonzalez B. Increased levels of proinflammatory cytokines in the aged rat brain attenuate injury-induced cytokine response after excitotoxic damage. *J Neurosci Res* 2009; 87(11):2484-2497.

Carlsson A, Winblad B. Influence of age and time interval between death and autopsy on dopamine and 3-methoxytyramine levels in human basal ganglia. *J Neural Transm* 1976; 38(3-4):271-6.

Carrillo MC, Kanai s, Sato Y, Kitani K.. Age related changes in antioxidants enzyme actives are region and organ, as well as sex selective in rats. 1992 *Mech Aging Dev* 65, 187-198.

Champy P, Höglinger GU, Féger J, Gleye C, Hocquemiller R, Laurens A, Guérineau V, Laprévotte O, Medja F, Lombès A, Michel PP, Lannuzel A, Hirsch EC, Ruberg M. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. *J Neurochem*. 2004; 88(1):63-9.

Chao CC, Hu S, Kravitz FH, Tsang M, Anderson WR, Peterson PK. Transforming growth factor beta in Alzheimer's disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994; 1:109-110.

Chen CM, Liu JL, Wu YR, Chen YC, Cheng HS, Cheng ML, Chiu DT. Increased oxidative damage in peripheral blood correlates with severity of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2009; 33(3):429-35.

Choi J, Sullards MC, Olzmann JA, Rees HD, Weintraub ST, Bostwick DE, Gearing M, Levey AI, Chin LS, Li L. Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. *J Biol Chem* 2006; 281(16):10816-24.

Cornelius E. Increased incidence of lymphomas in thymectomized mice evidence for an immunological theory of aging. *Experientia* 1972; 28: 459

Croisier E, Moran LB, Dexter DT, Pearce RK, Graeber MB. Microglial inflammation in the parkinsonian substantia nigra: relationship to alpha-synuclein deposition. *J Neuroinflammation* 2005; 3; 2:14.

Damier P, Hirsch EC, Zhang P, Agid Y, Javoy-Agid F. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* 1993; 52(1):1-6.

Davidovic M, Sevo G, Svorcan P, Milosevic DP, Despotovic N, Erceg P. Old age as a privilege of the "selfish ones" *Aging and Disease* 2010; 1: 139-146.

D'Anglemont de Tassigny X, Pascual A, López-Barneo J. GDNF-based therapies, GDNF-producing interneurons, and trophic support of the dopaminergic nigrostriatal pathway. Implications for Parkinson's disease. *Front Neuroanat.* 2015; 9:10.

Decressac M, Ulusoy A, Mattsson B, Georgievska B, Romero-Ramos M, Kirik D, Björklund A. GDNF fails to exert neuroprotection in a rat α -synuclein model of Parkinson's disease. *Brain* 2011; 134(Pt 8):2302-2311.

De Hoehn MM, Yahr MD. *Neurology*. 1977; 17:427-442,

Dexter DT, Carayon A, Vidailhet M, Ruberg M, Agid F, Agid Y, Lees AJ, Wells FR, Jenner P, Marsden CD. Decreased ferritin levels in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem* 1990; 55(1):16-20.

Dexter DT, Jenner P, Schapira AH, Marsden CD. Alterations in levels of iron, ferritin, and other trace metals in neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. *Ann Neurol* 1992; 32 Suppl: S94-100.

Donato AJ, Morgan RG, Walker AE, Lesniewski LA. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 2015; pii: S0022-2828(15)00034-6.

Double KL, Gerlach M, Youdim MB, Riederer P. Impaired iron homeostasis in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2000; 60: 37-58.

Escames G, López A, García JA, García L, Acuña-Castroviejo D, García JJ, López LC. The role of mitochondria in brain aging and the effects of melatonin. *Curr Neuropharmacol.* 2010; 8(3):182-193.

Estéves-González A, Kulisevsky J, Boltes A, Otermin P, García-Sánchez C. Rey verbal learning test is a useful tool for differential diagnosis in the preclinical phase of Alzheimer's disease: comparison with mild cognitive impairment and normal aging. *Int J Geriatr Psychiatry* 2003; 18: 1021–1028.

Fahn S.; Elton, R.L. en *Recent developments in Parkinson's disease.* Vol 2. Macmillan Health Care information: Florham Park, NJ; 153-164 1987

Fearnley JM, Lees AJ, Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 1991; 114: 2283-301.

Fernández-Espejo E, Caraballo I, Rodríguez de Fonseca F, Ferrer B, El Banoua F, Flores JA, Galan-Rodríguez B. Experimental parkinsonism alters anandamide precursor synthesis, and functional deficits are improved by AM404: a modulator of endocannabinoid function. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29(6):1134-42.

Fernández-Espejo E, Caraballo I, de Fonseca FR, El Banoua F, Ferrer B, Flores JA, Galan-Rodríguez B. Cannabinoid CB1 antagonists possess antiparkinsonian efficacy only in rats with very severe nigral lesion in experimental parkinsonism. *Neurobiol Dis* 2005; 18 (3):591-601.

Fernández-Espejo E. Pathogenesis of oxidative stress and the destructive cycle in the substantia nigra in Parkinson's disease. En: *Cortico-Subcortical Dynamics in Parkinson's Disease.* Tseng, Kuei-Yuan (Ed.) Nueva York: Humana Press, pp. 261-272, 2009.

Fernández Espejo E, García-Moreno JM, Martín de Pablos A, Chacón J. May the thyroid gland and thyroperoxidase participate in nitrosylation of serum proteins in sporadic Parkinson's disease? *Antioxid Redox Signal*. 2014; 21(15):2143-8.

Fernández Espejo E, García-Moreno JM, Martín de Pablos A, Chacón J. May the evaluation of nitrosative stress through selective increase of 3-nitrotyrosine proteins other than nitroalbumin and dominant tyrosine-125/136 nitrosylation of serum α -synuclein serve for diagnosis of sporadic Parkinson's disease? *Antioxid Redox Signal* 2013; 19(9):912-8.

Ferron SR, Marques-Torreon MA, Mira H, Flores I, Taylor K, Blasco MA, Fariñas I. Telomere shortening in neural stem cells disrupts neuronal differentiation and neuritogenesis. *J Neurosci* 2009; 29: 14394-14407

Fitzmaurice PS, Ang L, Guttman M, Rajput AH, Furukawa Y, Kish SJ. Nigral glutathione deficiency is not specific for idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord* 2003; 18(9):969-76.

Fjord-Larsen L, Johansen JL, Kusk P, Tornøe J, Grønborg M, Rosenblad C, Wahlberg LU. Efficient in vivo protection of nigral dopaminergic neurons by lentiviral gene transfer of a modified Neurturin construct. *Exp Neurol* 2005; 195:49–60.

Flores I, Cayuela ML, Blasco MA. Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. *Science* 2005; 309: 1253-1256.

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975; 12(3): 189-198.

Ganon WF. Fisiología Médica 19 ed. 2004. The McGraw-Hill Companies, INC

García-Moreno JM, Martín de Pablos A, García-Sánchez MI, Méndez-Lucena C, Damas-Hermoso F, Rus M, Chacón J, Fernández E. May serum levels of advanced oxidized

protein products serve as a prognostic marker of disease duration in patients with idiopathic Parkinson's disease? *Antioxid Redox Signal*. 2013; 18(11):1296-302.

Garcia-Ribas G, Rubio I, Lopez –Sendon JL, Casarejos MJ, Bascuñana M, García de Yebenes J. Sensibilidad de biomarcadoresw en el líquido cefalorraquídeo en enfermedades neurodegenerativas. *Alzheimer Real Invest Demenc*. 2011; 49: 26-32.

Gelpi E, Navarro-Otano J, Tolosa E, Gaig C, Compta Y, Rey MJ, Martí MJ, Hernández I, Valldeoriola F, Reñé R, Ribalta T. Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Mov Disord* 2014; 29(8):1010-8.

Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 1954; 119: 623-626.

Godbout JP, Johnson RW. Interleukin-6 in the aging brain. *J Neuroimmunol* 2004; 147(1-2):141-144.

González-Aparicio R, Flores JA, Fernández-Espejo E. Antiparkinsonian trophic action of glial cell line-derived neurotrophic factor and transforming growth factor β 1 is enhanced after co-infusion in rats. *Exp Neurol* 2010; 226(1):136-147.

Grune T, Merker K, Jung T, Sitte N, Davies KJ. Protein oxidation and degradation during postmitotic senescence. *Free Radic Biol Med* 2005; 39(9):1208-1215.

Guo J, Sun Z, Xiao S, Liu D, Jin G, Wang E, Zhou J, Zhou J. Proteomic analysis of the cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients. *Cell Res* 2009; 19(12):1401-3.

Guyton AC, Hall JE. *Fisiología Médica*. Barcelona: Editorial Elsevier España, 2012.

Hall A, Karplus PA, Poole LB. Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions. *FEBS J* 2009; 276(9):2469-77.

Hallwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and Medicine. Nueva York: Oxford Press, 1999.

Hardeland R, Cardinali DP, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin and brain inflammaging. Prog Neurobiol 2015. pii: S0301-0082(15)00010-6. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.02.001.

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol 1956; 11: 298-300.

Haycock JW, Becker L, Ang L, Furukawa Y, Hornykiewicz O, Kish SJ. Marked disparity between age-related changes in dopamine and other presynaptic dopaminergic markers in human striatum. J Neurochem. 2003; 87(3):574-85.

Hayes JD, Flanagan IU, Jowsey IR. Glutathione transferases. Annu Rev Pharmacol. Toxicol. 2005; 45:51–88.

Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res 1961; 25: 585-621.

Hiramatsu M, Kohno M, Edamatsu R, Mitsuta K, Mori A. Increased superoxidodismutase activity in aged human cerebrospinal fluid and rat brain determined by electron spin resonance spectrometry using the spin trap method. J Nuerochem. 1992; 58 (·) 1160-1164.

Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? Lancet Neurol 2009; 8(4):382-397.

Hirsch EC, Vyas S, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord 2012; 18 Suppl 1: S210-212.

Hjalmarsson K, Marklund SL, Engström A, Edlund T. Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 Sep;84(18):6340-6344.

Hong Z, Shi M, Chung KA, Quinn JF, Peskind ER, Galasko D, Jankovic J, Zabetian CP, Leverenz JB, Baird G, Montine TJ, Hancock AM, Hwang H, Pan C, Bradner J, Kang UJ, Jensen PH, Zhang J. DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. *Brain* 2010 Mar;133(Pt 3):713-726.

Horger BA, Nishimura MC, Armanini MP, Wang LC, Poulsen KT, Rosenblad C, Kirik D, Moffat B, Simmons L, Johnson E Jr, et al. Neurturin exerts potent actions on survival and function of midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* 1998; 18:4929-4237.

Hornykiewicz O. Ageing and neurotoxins as causative factors in idiopathic Parkinson's disease--a critical analysis of the neurochemical evidence. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1989;13(3-4):319-28.

Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev* 2007; 87: 1175-1213.

Hunot S, Bernard V, Faucheux B, Boissière F, Leguern E, Brana C, Gautris PP, Guérin J, Bloch B, Agid Y, Hirsch EC. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) gene expression in the human brain: a post mortem in situ hybridization study with special reference to Parkinson's disease. *J Neural Transm* 1996; 103(8-9):1043-52.

Hurst JH, LeWitt PA, Burns RS, Foster NL, Lovenberg W. CSF dopamine-beta-hydroxylase activity in Parkinson's disease. *Neurology* 1985; 35(4):565-568.

Hurtig HI, Trojanowski JQ, Galvin J, Ewbank D, Schmidt ML, Lee VM, Clark CM, Glosser G, Stern MB, Gollomp SM, Arnold SE. Alpha-synuclein cortical Lewy bodies correlate with dementia in Parkinson's disease. *Neurology* 2000; 54(10):1916-1921.

Ilic TV, Jovanovic M, Jovicic A, Tomovic M. Oxidative stress indicators are elevated in de novo Parkinson's disease patients. *Funct Neurol* 1999; 14(3):141-147.

Im JY, Kim D, Paik SG, Han PL. Cyclooxygenase-2-dependent neuronal death proceeds via superoxide anion generation. *Free Radic Biol Med*. 2006; 15;41(6):960-972.

Isobe C, Abe T, Terayama Y. Levels of reduced and oxidized coenzyme Q-10 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the cerebrospinal fluid of patients with living Parkinson's disease demonstrate that mitochondrial oxidative damage and/or oxidative DNA damage contributes to the neurodegenerative process. *Neurosci Lett* 2010; 469(1):159-163.

Iwanaga K, Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tomita I, Satoh H. Takashima H, et al. Lewy body-type degeneration in cardiac plexus in Parkinson's and incidental Lewy Body diseases. *Neurology* 1999; 52:1269-1271.

Jefferson AL, Byerly LK, Vanderhill S, Lambe S, Wong S, Ozonoff A, Karlawish JH. Characterization of activities of daily living in individuals with mild cognitive impairment. *Am J Geriatr Psychiatry* 2008; 16: 375–383.

Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 53: S26-36.

Ji LL. Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress? *Ann N.Y. Acad. Sci.* 2001; 928,236-247.

Jin K, Minami M, Xie L, Sun Y, Mao XO, Wang Y, Simon RP, Greenberg DA. Ischemia-induced neurogenesis is preserved but reduced in the aged rodent brain. *Aging Cell* 2004; 3: 373-377.

Joseph PD. Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. *Hum. Genomics Proteomics*. 2010; 876940.

Kanaan NM, Kordower JH, Collier TJ. Age-related accumulation of Marinesco bodies and lipofuscin in rhesus monkey midbrain dopamine neurons: relevance to selective neuronal vulnerability. *J Comp Neurol* 2007; 502(5):683-700.

Karamohamed S, Latourelle JC, Racette BA, Perlmutter JS, Wooten GF, Lew M, Klein C, Shill H, Golbe LI, Mark MH, Guttman M, Nicholson G, Wilk JB, Saint-Hilaire M, DeStefano AL, Prakash R, Tobin S, Williamson J, Suchowersky O, Labell N, Growdon BN,

Kimpara T, Takeda A, Yamaguchi T, Arai H, Takase S, Sasaki H, Itoyama I. Increased bilirubins and their derivatives in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Nurobiol. Aging* 2000; 21 (4), 551-554.

Kish SJ, Shannak K, Hornykiewicz O. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *N Engl J Med* 1988; 318(14):876-880.

Kish SJ, Shannak K, Rajput A, Deck JH, Hornykiewicz O. Aging produces a specific pattern of striatal dopamine loss: implications for the etiology of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurochem* 1992; 58(2):642-648.

Kish SJ, Morito C, Hornykiewicz O. Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain. *Neurosci Lett* 1985; 58(3):343-346.

Kordower JH, Bjorklund A. Trophic factor gene therapy for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2013; 28(1):96-109.

Korhonen L, Riikonen R, Nawa H, Lindholm D. Brain derived neurotrophic factor is increased in cerebrospinal fluid of children suffering from asphyxia. *Neurosci Lett* 1998; 240(3):151-154.

Kriegstein K, Henheik P, Farkas L, Jaszai J, Galter D, Krohn K, Unsicker K. Glia cell line-derived neurotrophic factor requires transforming growth factor-beta for exerting its full neurotrophic potential on peripheral and CNS neurons. *J Neurosci* 1998a; 18:9822-9834.

Krieglstein K, Reuss B, Maysinger D, Unsicker K. Transforming growth factor-beta mediates the neurotrophic effect of fibroblast growth factor-2 on midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 1998b; 10: 2746-2750.

Krieglstein K, Strelau J, Schober A, Sullivan A, Unsicker K. TGF β and the regulation of neuron survival and death. *J Physiol (Paris)* 2002; 96:25-30.

Krieglstein K, Unsicker K. Transforming growth factor-beta promotes survival of midbrain dopaminergic neurons and protects them against N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity. *Neuroscience* 1994; 63(4):1189-1196.

Kroksveen AC, Opsahl JA, Aye TT, Ulvik RJ, Berven FS. Proteomics of human cerebrospinal fluid: discovery and verification of biomarker candidates in neurodegenerative diseases using quantitative proteomics. *J Proteomics* 2011; 74(4):371-388.

Kubota C, Torii S, Hou N, Saito N, Yoshimoto Y, Imai H, Takeuchi T. Constitutive reactive oxygen species generation from autophagosome/lysosome in neuronal oxidative toxicity. *J Biol Chem* 2010; 285(1):667-674.

Kuiper MA, Mulder C, van Kamp GJ, Scheltens P, Wolters EC. Cerebrospinal fluid ferritin levels of patients with Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and multiple system atrophy. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 1994; 7(2):109-114.

Lai SW, Chen JH, Lin HY, Liu YS, Tsai CF, Chang PC, Lu DY, Lin C. Regulatory Effects of Neuroinflammatory Responses Through Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in Microglial Cells. *Mol Neurobiol* 2018; 55(9): 7487-7499.

Lang AE, Gill S, Patel NK, Lozano A, Nutt JG, Penn R, Brooks DJ, Hotton G, Moro E, Heywood P, Brodsky MA, Burchiel K, Kelly P, Dalvi A, Scott B, Stacy M, Turner D, Wooten VG, Elias WJ, Laws ER, Dhawan V, Stoessl AJ, Matcham J, Coffey RJ, Traub M. Randomized

controlled trial of intraputamenal glial cellline-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann Neurol* 2006; 59(3):459-466.

Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. 1983; 219(4587):979-980.

Langston JW, Ballard PA Jr. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med*. 1983; 309(5):310.

Larsson NO. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *Annu Rev Biochem* 2010, 79: 683-706.

Lawton MP, Brody EM. Assessment of older people: Self-maintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist* 1969; 9: 179–186.

Lee CS, Schulzer M, Mak EK, Snow BJ, Tsui JK, Calne S, Hammerstad J, Calne DB. Clinical observations on the rate of progression of idiopathic parkinsonism. *Brain* 1994; 117 (Pt 3):501-507.

Lee PH, Lee G, Park HJ, Bang OY, Joo IS, Huh K. The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neural Transm* 2006; 113(10):1435-1439.

Lefvert AK, Link H. IgG production within the central nervous system: acritical review of proposed formulae. *Ann Neurol* 1985; 17(1):13-20.

Lewy FH. Paralysis agitans. En: Lewandowsky M, editor. *Pathologische Anatomie. Handbuch der Neurologie*. Berlin: Springer Verlag; pp. 920–933, 1912.

Li L, Ishdorj G, Gibson SB. Reactive oxygen species regulation of autophagy in cancer: implications for cancer treatment. *Free Radic Biol Med*. 2012; 53(7):1399-1410.

Li W, Hoffman PN, Stirling W, Price DL, Lee MK. Axonal transport of human alpha-synuclein slows with aging but is not affected by familial Parkinson's disease-linked mutations. *J Neurochem* 2004; 88(2):401-410.

Lin MT, Cantuti-Castelvetri I, Zheng K, Jackson KE, Tan YB, Arzberger T, Lees AJ, Betensky RA, Beal MF, Simon DK. Somatic mitochondrial DNA mutations in early Parkinson and incidental Lewy body disease. *Ann Neurol* 2012; 71(6):850-854.

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF, a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 1993; 260:1130-1132.

Link H, Tibbling G. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. III. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest* 1977; 37(5):397-401.

Liu Q, Berchner-Pfannschmidt U, Möller U, Brecht M, Wotzlaw C, Acker H, Jungermann K, Kietzmann T. A Fenton reaction at the endoplasmic reticulum is involved in the redox control of hypoxia-inducible gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(12):4302-4307.

Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso compounds. *Nature* 1993; 364(6438): 626-632.

Lobo A, Ezquerro J, Gómez-Burgada F, Sala JM, Seva-Díaz A. Cognitive mini-test (a simple practical test to detect intellectual changes in medical patients). *Actas Luso Esp Neurol Psiquiatr Cienc Afines* 1979; 7(3): 189-202.

Long J, Gao F, Tong L, Cotman CW, Ames BN, Liu J. Mitochondrial decay in the brains of old rats: ameliorating effect of alpha-lipoic acid and acetyl-L-carnitine. *Neurochem Res*. 2009; 34(4):755-763.

Lourbopoulos A, Ertürk A, Hellal F. Microglia in action: how aging and injury can change the brain's guardians. *Front Cell Neurosci* 2015; 23;9: 54.

Lovell MA, Xie C, Marksbery WR. Decreased glutathione transferase activity in brain and ventricular fluid in Alzheimer's disease. *Neurology* 1998; 51 (6), 1562-1566.

Lladó A, Sanchez-Valle R. El laboratorio clínico en las enfermedades neurodegenerativas. *Ed Cont Lab Clin* 2011; 14:1-13

Maarouf CL, Beach TG, Adler CH, Shill HA, Sabbagh MN, Wu T, Walker DG, Kokjohn TA, Roher AE, Arizona PD Consortium. Cerebrospinal fluid biomarkers of neuropathologically diagnosed Parkinson's disease subjects. *Neurol Res* 2012; 34(7):669-676.

Macintosh R, Lee JA, Atkinson RS. Lumbar puncture and Spinal Analgesia-Intradural and Extradural. 4^{ed} 1988. Churchill Livingstone ISBN 84-345-1882-1.

Mahlknecht P, Iranzo A, Högl B, Frauscher B, Müller C, Santamaría J, Tolosa E, Serradell M, Mitterling T, Gschliesser V, Goebel G, Brugger F, Scherfler C, Poewe W, Seppi K; Sleep Innsbruck Barcelona Group. Olfactory dysfunction predicts early transition to a Lewy body disease in idiopathic RBD. *Neurology*. 2015; 84(7):654-658.

Maggio M, Guralnik JM, Longo DL, Ferrucci L. Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006; 61(6):575-584.

Malik M, Jividen K, Padmakumar VC, Cataisson C, Li L, Lee J, Howard OM, Yuspa SH. Inducible NOS-induced chloride intracellular channel 4 (CLIC4) nuclear translocation regulates macrophage deactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(16):6130-6135.

Manubens JM, Martínez-Lage P, Martínez-Lage JM, Larumbe R, Muruzábal J, Martínez-González MA, Guarch C, Urrutia T, Sarrasqueta P, Lacruz F. Variación de las puntuaciones del Mini-Mental con la edad y el nivel educativo. Datos normalizados en la población mayor de 70 años de Pamplona. *Neurologia* 1998; 13(3): 111-119.

Marksbery WR, Carney JM. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 1999; 9(1), 133-146.

Martin M , Macias M, Escames G, Leon J, Acuña-Castroviejo D. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hidroperoxide induced mitochondrial oxidative stresses. *Faseb J.* 2000; 14: 1677-1697.

Martin WE, Young WI, Anderson VE. Parkinson's disease: a genetic study. *Brain* 1973; 96: 495-506.

Masjuan J, Álvarez-Cermeño JC, García-Barragán N, Díaz-Sánchez M, Espiño M, Sádaba MC et al. Clinically isolated syndromes: a new oligoclonal band test accurately predicts conversion to MS. *Neurology* 2006; 66: 576–578.

Massaro AR, Scivoletto G, Tonali P. Cerebrospinal fluid markers in neurological diseases. *Ital J Neurol Sci* 1990; 11(6): 537-547.

Mateo I, Infante J, Sánchez-Juan P, García-Gorostiaga I, Rodríguez-Rodríguez E, Vázquez-Higuera JL, Berciano J, Combarros O. Serum heme oxygenase-1 levels are increased in Parkinson's disease but not in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand.* 2010; 121(2):136-8.

Mazzetti AP, Fiorile MC, Primavera A, Lo Bello M. Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. *Neurochem Int* 2015; 82:10-8.

McCay CM. Iodized Salt a Hundred Years Ago. *Science* 1935; 82: 350-351.

McGeer PL, Itagaki S, Akiyama H, *McGeer* EG. Comparison of neuronal loss in Parkinson's disease and aging. En: Calne DB, Comi G, Crippa D, Horowski R, Trabucchi M, editores. *Parkinsonism and Aging*. Raven Press: New York, pp. 25-34, 1989.

McGeer PL, McGeer EG, Suzuki JS. Aging and extrapyramidal function. *Arch Neurol* 1977; 34(1):33-35.

McNaught KS, Mytilineou C, Jnobaptiste R, Yabut J, Shashidharan P, Jennert P, Olanow CW. Impairment of the ubiquitin-proteasome system causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures. *J. Neurochem* 2002; 81:301-306.

Miersch S, Espey MG, Chaube R, Akarca A, Tweten R, Ananvoranich S, Mutus B. Plasma membrane cholesterol content affects nitric oxide diffusion dynamics and signaling. *J Biol Chem* 2008; 283(27):18513-21.

Milles MV, Morrison JA, Horn PS, Tang PH, Pesce AJ. Coenzyme Q 10 ichanges are associated with metabolic syndrome. *Clin. Chim.* 2004; Acta 244 (I-2)

Mogi M, Harada M, Kondo T, Narabayashi H, Riederer P, Nagatsu T. Transforming growth factor beta-1 levels are elevated in the striatum and in ventricular cerebrospinal fluid in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1995; 193: 129-132.

Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Kogure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T. Glial cell line-derived neurotrophic factor in the substantia nigra from control and parkinsonian brains. *Neurosci Lett* 2001; 300:179-381.

Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T. Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1999; 270(1):45-48.

Moller P, Lohr M, Folkmann JK, Mikkelsen L, Loft S. Aging and oxidatively damaged nuclear DNA in animal organs. *Free Rad Biol Med* 2010; 48: 1275-1285.

Mollenhauer B, Cullen V, Kahn I, Krastins B, Outeiro TF, Pepivani I, Ng J, Schulz-Schaeffer W, Kretschmar HA, McLean PJ, Trenkwalder C, Sarracino DA, Vonsattel JP, Locascio JJ, El-Agnaf OM, Schlossmacher MG. Direct quantification of CSF alpha-synuclein by ELISA and first cross-sectional study in patients with neurodegeneration. *Exp Neurol* 2008; 213(2):315-325.

Monge-Argilés JA, Sanchez-Paya J, Muñoz-Ruiz A et al. Pacientes con deterioro cognitivo leve y reducción de la proteína A β ₂₁₋₄₂ en LCR evolucionan rápidamente a enfermedad de Alzheimer. *Neurología*. 2012; 27(1): 28-33.

Monge-Argilés JA, Sanchez-Paya J, Muñoz-Ruiz A et al. Biomarcadores en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con deterioro cognitivo leve: metaanálisis de su capacidad predictive para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol* 2010; 50: 193-200.

Montejo-Carrasco P, Montenegro-Peña M, Sueiro MJ. The Memory Failures of Everyday (MFE) test: normative data in adults. *Span J Psychol* 2012; 15(3): 1424-1431.

Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 2005; 28:57-87.

Morens DM, Davis JW, Grandinetti A, Ross GW, Popper JS, White LR. Epidemiologic observations on Parkinson's disease: incidence and mortality in a prospective study of middle-aged men. *Neurology* 1996; 46(4):1044-1050

Morris JC, Heyman A, Mohs RC. Mild Cognitive Impairment represents early stage Alzheimers-Disease. *Archives of Neurology* 2012, 58:397-405.

Morrish PK, Sawle GV, Brooks DJ, An [18F]dopa-PET and clinical study of the rate of progression in Parkinson's disease, *Brain* 1996; 119: 585-591.

Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 2004; 279(47):49064-73.

Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2001; 63(1):71-124.

Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009; 417(1):1-13.

Nakamura T, Lipton SA. Redox modulation by S-nitros(yl)ation contributes to protein misfolding, mitochondrial dynamics, and neuronal synaptic damage in neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ*, 2011; 18(9): 1478-1486.

Navarro-Yepes J, Burns M, Anandhan A, Khalimonchuk O, del Razo LM, Quintanilla-Vega B, Pappa A, Panayiotidis MI, Franco R. Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxid Redox Signal* 2014; 21(1):66-85.

Nelson KJ, Parsonage D. Measurement of peroxiredoxin activity. *Curr Protoc Toxicol* 2011, 7: Unit7.10.

Nishimura M, Kuno S, Kaji R, Kawakami H. Brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms in Japanese patients with sporadic Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and multiple system atrophy. *Mov Disord* 2005; 20(8):1031-3.

Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, Jankovic J, Lang AE, Laws ER Jr, Lozano AM, Penn RD, Simpson RK Jr, Stacy M, Wooten GF; ICV GDNF Study Group. Implanted intracerebroventricular Glial cell line-derived neurotrophic factor. Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology* 2003; 60(1):69-73.

Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 2001; 276(42): 38388-38393.

Odagiri S, Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Kamitani T, Wakabayashi K. Immunohistochemical analysis of Marinesco bodies, using antibodies against proteins implicated in the ubiquitin-proteasome system, autophagy and aggresome formation. *Neuropathology* 2012; 32(3):261-266.

Okabe T, Hamaguchi V, Inafuku T, Hara M. Aging and superoxidodismutase activity incerebrospinal fluid. J. Neurol Sci. 1996; 141, 100-104.

Olazarán J, Mouronte P, Bermejo F. Validez clínica de dos escalas de actividades instrumentales en la enfermedad de Alzheimer. Neurología 2005; 20(8): 395-401.

Olanow CW, Tatton WG. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. Annu Rev Neurosci 1999; 22:123-44.

Olivieri S, Conti A, Iannaccone S, Cannistraci CV, Campanella A, Barbariga M, Codazzi F, Pelizzoni I, Magnani G, Pesca M, Franciotta D, Cappa SF, Alessio M. Ceruloplasmin oxidation, a feature of Parkinson's disease CSF, inhibits ferroxidase activity and promotes cellular iron retention. J Neurosci 2011; 31(50):18568-18577.

Olson L, Backlund EO, Gerhardt G, Hoffer B, Lindvall O, Rose G, Seiger A, Strömberg I. Nigral and adrenal grafts in parkinsonism: recent basic and clinical studies. Adv Neurol 1987; 45:85-94.

Pahapill PA, Lozano AM. The pedunclopontine nucleus and Parkinson's disease. Brain 2000; 123 (Pt 9):1767-83.

Patterson SL. Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: Interactions of microglia, IL-1 β , BDNF and synaptic plasticity. Neuropharmacology 2014; 27.pii: S0028-3908(14)00471-7.

Perneczky R, Pohl C, Sorg C, Hartmann J, Komossa K, Alexopoulos P, Wagenpfeil S, Kurz A. Complex activities of daily living in mild cognitive impairment: Conceptual and diagnostic issues. Age Ageing 2006; 35: 240–245.

Perry TL, Godin DV, Hansen S. Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency? Neurosci Lett 1982; 33(3):305-310.

Pertusa M, García-Matas S, Rodríguez-Farré E, Sanfeliu C, Cristòfol R. Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *J Neurochem* 2007; 101(3):794-805.

Petzold A, Psotta L, Brigadski T, Endres T, Lessmann V. Chronic BDNF deficiency leads to an age-dependent impairment in spatial learning. *Neurobiol Learn Mem* 2015; 120:52-60.

Pfeffer RI, Kurosaki TT, Harrah CH Jr, Chance JM, Filos S. Measurement of functional activities in older adults in the community. *J. Gerontol* 1982; 37(3): 323-329.

Phillipson OT. Management of the aging risk factor for Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2014; 35(4):847-857.

Poewe W. The clinical spectrum of Lewy body disorders. En: Tolosa E, Shultz JB, McKeith IG, Ferrer I, editores. *Neurodegenerative disorders associated with alfa-synuclein pathology*. Barcelona: Ars Medica, p. 73-82, 2002.

Prigione A, Begni B, Galbussera A, Beretta S, Brighina L, Garofalo R, Andreoni S, Piolti R, Ferrarese C. Oxidative stress in peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease: negative correlation with levodopa dosage. *Neurobiol Dis* 2006; 23(1):36-43.

Reiber H, Ruff M, Uhr M. Ascorbate concentration in human cerebrospinal fluid (CSF) and serum. Intrathecal accumulation and CSF flow rate. *Clin Chim Acta* 1993; 217(2):163-173.

Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A, Mariani E, Mattioli P, Cherubini A, Catani M, Cecchetti R, Senin U, Mecocci P. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2003; 24 (7), 915-919.

Ritzel RM, Patel AR, Pan S, Crapser J, Hammond M, Jellison E, McCullough LD. Age- and location-related changes in microglial function. *Neurobiol Aging* 2015. pii: S0197-4580(15)00116-5.

Rodriguez-Segade S. Luíquido Cefalorraquídeo. Ed Cont Lab Clin 2006; 9:49-56

Rodrigues Siqueira I, Fochesatto C, da Silva Torres IL, Dalmaz C, Alexandre Netto C. Aging affects oxidative state in hippocampus, hypothalamus, and adrenal glands of Wistar rats. Life Sci. 2005; 78 (3), 271-278.

Rollo CD. Aging and the Mammalian Regulatory Triumvirate. Aging and Disease 2010; 1: 105-138.

Rosenblad C, Kirik D, Devaux B, Moffat B, Phillips HS, Björklund A. Protection and regeneration of nigral dopaminergic neurons by neurturin or GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease after administration into the striatum or the lateral ventricle. Eur J Neurosci 1999; 11:1554-1566.

Rosenblad C, Grønborg M, Hansen C, Blom N, Meyer M, Johansen J, Dagø L, Kirik D, Patel UA, Lundberg C et al. In vivo protection of nigral dopamine neurons by lentiviral gene transfer of the novel GDNF-family member neublastin/artemin. Mol Cell Neurosci 2000; 15(2):199-214.

Roussa E, Oehlke O, Rahhal B, Heermann S, Heidrich S, Wiehle M, Krieglstein K. Transforming growth factor beta cooperates with persephin for dopaminergic phenotype induction. Stem Cells 2008; 26(7):1683-1694.

Rozemuller AJ, van Gool WA, Eikelenboom P. The neuroinflammatory response in plaques and amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: therapeutic implications. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 2005; 4: 223-233.

Ryan JJ, Geisser ME. Validity and diagnostic accuracy of an alternate form of the Rey Auditory Verbal Learning Test. Arch Clin Neuropsychol 1986; 1(3): 209-217.

Saavedra A, Baltazar G, Santos P, Carvalho CM, Duarte EP. Selective injury to dopaminergic neurons up-regulates GDNF in substantia nigra postnatal cell cultures: role of neuron-glia crosstalk. Neurobiol Dis 2006; 23(3):533-542.

Sádaba MC, González Porqué P, Masjuan J, Alvarez-Cermeño JC, Bootello A, Villar LM. An ultrasensitive method for the detection of oligoclonal IgG bands. *J Immunol Methods* 2004; 284: 141-145.

Salehi Z, Mashayekhi F. Brain-derived neurotrophic factor concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *J Clin Neurosci*. 2009; 16(1):90-93.

Salvatore MF, Zhang JL, Large DM, Wilson PE, Gash CR, Thomas TC, Haycock JW, Bing G, Stanford JA, Gash DM, Gerhardt GA. Striatal GDNF administration increases tyrosine hydroxylase phosphorylation in the rat striatum and substantia nigra. *J Neurochem* 2004; 90(1):245-254.

Sauer H, Fischer W, Nikkhah G, Wiegand SJ, Brundin P, Lindsay RM, Björklund A. Brain-derived neurotrophic factor enhances function rather than survival of intrastriatal dopamine cell-rich grafts. *Brain Res* 1993; 626(1-2):37-44.

Scherman D, Desnos C, Darchen F, Pollak P, Javoy-Agid F, Agid Y. Striatal dopamine deficiency in Parkinson's disease: role of aging. *Ann Neurol* 1989; 26: 551-557.

Schönfeld P, Dymkowska D, Wojtczak L. Acyl-CoA-induced generation of reactive oxygen species in mitochondrial preparations is due to the presence of peroxisomes. *Free Radic Biol Med* 2009; 47(5):503-509.

Schober A, Hertel R, Arumäe U, Farkas L, Jaszai J, Kriegstein K, Saarma M, Unsicker K. Glial cell line-derived neurotrophic factor rescues target-deprived sympathetic spinal cord neurons but requires transforming growth factor-beta as cofactor in vivo. *J Neurosci* 1999; 19(6):2008-2015.

Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M. Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab* 2007; 6: 280-293.

Schwartz JH, Kandel ER, Jessell TM. Principios de Neurociencia. México: McGraw-Hill Interamericana. 2001.

Schwarz J, Storch A, Koch W, Pogarell O, Radau PE, Tatsch K, Loss of dopamine transporter binding in Parkinson's disease follows a single exponential rather than linear decline, J Nucl Med 2004; 45(10): 1694-1697.

Sevillano García MD, Cacabelos Pérez P, Cacho Gutiérrez J. Alteraciones del líquido cefalorraquídeo y de su circulación: hidrocefalia, pseudotumor cerebral y síndrome de presión baja. Medicine 2011; 71:4814-4825.

Seyfert S, Kunzmann V, Schwertfeger et al. Determinants of lumbar CSF protein concentration. J Neurol 2002; 249: 1021-6.

Shapira AHV, Cooper JM, Dexter D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. Lancet 1989; 1:1269.

Sher L, Oquendo MA, Li S, Huang YY, Grunebaum MF, Burke AK, Malone KM, Mann JJ. Lower CSF homovanillic acid levels in depressed patients with a history of alcoholism. Neuropsychopharmacology 2003; 28(9):1712-1719.

Shimokawa I, Trindade LS. Dietary Restriction and Aging in Rodents: a Current View on its Molecular Mechanisms. Aging Dis 2010; 1: 89-104.

Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. Nature 2001; 410: 372-376.

Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. Ann Neurol 1994; 36: 348-355.

Sian-Hülsmann J, Mandel S, Youdim MB, Riederer P. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. J Neurochem 2011; 118(6):939-957.

Singhal SS, Singh SP, Singhal P, Horne D, Singhal J, Awasthi S. Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015; 289(3):361-370.

Singer C, Watts R, Goldwurm S, Pezzoli G, Baker KB, Giroux ML, Pramstaller PP, Burn DJ, Chinnery P, Sherman S, Vieregge P, Litvan I, Gusella JF, Myers RH, Parsian A. BDNF genetic variants are associated with onset age of familial Parkinson disease: GenePD Study. *Neurology* 2005; 65(11):1823-5.

Smeyne M, Boyd J, Raviie Shepherd K, Jiao Y, Pond BB, Hatler M, Wolf R, Henderson C, Smeyne RJ. GSTpi expression mediates dopaminergic neuron sensitivity in experimental parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(6): 1977-1982

Sofic E, Riederer P, Heinsen H, Beckman H, Reynolds GP, Hebenstreit G, Youdim MB. Increased iron (III) and total iron content in postmortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J. Neural Trans* 1988; 74: 199-205.

Spencer NY, Yan Z, Boudreau RL, Zhang Y, Luo M, Li Q, Tian X, Shah AM, Davisson RL, Davidson B, Banfi B, Engelhardt JF. Control of hepatic nuclear superoxide production by glucose 6-phosphate dehydrogenase and NADPH oxidase-4. *J Biol Chem.* 2011; 286(11):8977-8987.

Spindler M, Beal MF, Henchcliffe C. Coenzyme Q10 effects in neurodegenerative disease. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2009; 5:597-610.

Stark AK, Pakkenberg B. Histological changes of the dopaminergic nigrostriatal system in aging. *Cell Tissue Res* 2004; 318(1):81-92.

Stern MB, Lang A, Poewe W, Toward a redefinition of Parkinson's disease, *Mov Disord* 2012; 27(1): 54-60.

Strasinger SK, Di Lorenzo MS. Análisis de orina y de los líquidos corporales. 2010, 5ª ed. Editorial Panamericana

Straten G, Schweiler GW, Maetzler W, Laske C, Leyhe T. Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) concentrations in cerebrospinal fluid and serum of patients with early Alzheimer's disease and normal controls. J Alzheimers Dis. 2009; 18 (2), 331-337.

Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Cepanec C, Pessayre D, Degoul F. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. Pharmacogenetics 2003; 13(3):145-157.

Takeoka T, Shinohara Y, Furumi K, Mori K. Characteristic protein fractions of cerebrospinal fluid disc electrophoresis analysis. Brain Res 1980; 198: 147-56.

Tanner CM, Goldman SM. Epidemiology of Parkinson's disease. Neurol Clin 1996; 14(2):317-335.

Taupin P. Aging and Neurogenesis, a Lesion from Alzheimer's Disease, Aging Dis 2010; 1: 89-104.

Teunissen CE, de Veite J, Steinbusch HW, et al. Biochemical markers related to Alzheimer's dementia in serum and cerebrospinal fluid. Neurobiol Aging 2002 ; 23 : 485-508.

Teunissen CE, Petzold A, Bennett JL, Berven FS, Brundin L, Comabella M et al. A consensus protocol for the standardization of cerebral fluid collection and biobanking. Neurology 2009; 73:1914-1922.

Thompson EJ (ed). The CSF proteins: a biochemical approach. Elsevier, 1988

Torres LI, Quaglio NB, de Souza GT, Garcia RT, Dati IM, Moreira WI, Loureiro AP, de Souza-Talarico JN, Smid J, Porto CS, Bottino CM, Marcourakis T. Peripheral oxidative

stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2011; 26 (1), 59-68.

Unsicker K, Flanders KC, Cissel DS, Lafyatis R, Sporn MB. Transforming growth factor beta isoforms in the adult rat central and peripheral nervous system. Neuroscience 1991; 44(3): 613-25.

Valldcabres C, Gella A, Castillo C, Perez D, Martinez C, Llompart A. Recomendaciones para el estudio de las proteínas del líquido cefalorraquídeo. Recomendación 2014. Comisión de Proteínas, Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Quimica Clinica 2002; 2183-90.

van Dijk KD, Teunissen CE, Drukarch B, Jimenez CR, Groenewegen HJ, Berendse HW, van de Berg WD. Diagnostic cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson's disease: a pathogenetically based approach. Neurobiol Dis 2010; 39(3): 229-241.

van Heemst D. Insulin, IGF-1 and longevity. Aging Dis 2010; 1: 147-157.

Vawter MP, Dillon-Carter O, Tourtellotte WW, Carvey P, Freed WJ. TGF β 1 and TGF β 2 concentrations are elevated in Parkinson's disease in ventricular cerebrospinal fluid. Exp Neurol 1996; 142: 313-322.

Wakabayashi K, Takahashi H, Ohama E, Ikuta F. Parkinson's disease: an immunohistochemical study of Lewy body-containing neurons in the enteric nervous system. Acta Neuropathol (Ber) 1990; 79:581-583.

Walker DG, Beach TG, Xu R, Lile J, Beck KD, McGeer EG, McGeer PL. Expression of the proto-oncogene Ret, a component of the GDNF receptor complex, persists in human substantia nigra neurons in Parkinson's disease. Brain Res 1998; 792: 207-217.

Wang C, Liu L, Zhang L, Peng Y, Zhou F. Redox reactions of the α -synuclein-Cu (2+) complex and their effects on neuronal cell viability. Biochemistry 2010; 49(37):8134-8142.

Waragai M, Wei J, Fujita M, Nakai M, Ho GJ, Masliah E, Akatsu H, Yamada T, Hashimoto M. Increased level of DJ-1 in the cerebrospinal fluids of sporadic Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345(3): 967-72.

Wechsler CE. WMS-III escala de memoria de Wechsler-III: manual de aplicacion y puntuación. 2004. TEA Ediciones.

Wilson R., Leurgans S, Boyle PA, Bennett D. Decline in Prodromal Alzheimer Sisease and Mild Cognitive Impairment. *Arhive of Neurology* 2011, 68, 351-356.

Witko-Sarsat V, Allen RC, Paulais M, Nguyen AT, Bessou G, Lenoir G, Descamps-Latscha B. Disturbed myeloperoxidase-dependent activity of neutrophils in cystic fibrosis homozygotes and heterozygotes, and its correction by amiloride. *J Immunol* 1996; 157(6): 2728-2735.

Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, Jungers P, Drüeke TB, Descamps-Latscha B, Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress in uraemia, *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 76-78.

Wolters ECh, Braak H, Parkinson's disease: premotor clinico-pathological correlations, *J Neural Transm Suppl* 2006; 70: 309-319.

Wu Y, Fan Y, Xue B, Luo L, Shen J, Zhang S, Jiang Y, Yin Z. Human glutathione S-transferase P1-1 interacts with TRAF2 and regulates TRAF2-ASK1 signals. *Oncogene* 2006; 25(42): 5787-5800.

Wyss-Coray T, Lin C, Yan F, Yu GQ, Rohde M, McConlogue L, Masliah E, Mucke L. TGFβ1 promotes microglial amyloid-β clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nature Med* 2001; 7: 612-618.

Xia YX, Ikeda T, Xia XY, Ikenoue T. Differential neurotrophin levels in cerebrospinal fluid and their changes during development in newborn rat. *Neurosci Lett* 2000; 280(3): 220-222.

Yuen P, Baxter DW. The morphology of Marinesco bodies (paranucleolar corpuscles) in the melanin-pigmented nuclei of the brain-stem. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1963; 26: 178-83.

Zang X, Zeng L, Yu T, Xu Y, Pu S, Du D, Jiang W.. Positive feedback loop of autocrine BDNF from microglia activation. *Cell Physiol. Biochem.* 2014; 34 (3): 715-723.

Zetterberg H, Andreasen N, Blennow K. Increased cerebrospinal fluid levels of transforming growth factor-beta1 in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2004; 367(2): 194-196.

Zhang J, Sokal I, Peskind ER, Quinn JF, Jankovic J, Kenney C, Chung KA, Millard SP, Nutt JG, Montine TJ. CSF multianalyte profile distinguishes Alzheimer and Parkinson diseases. *Am J Clin Pathol* 2008; 129(4): 526-529.

Zhang L, Nie ZY, Liu Y, Chen W, Xin SM, Sun XD, Fan JH, Liu YH, Gao XH, Lu LQ, Como P, McDermott MP, Qiao YL, Kieburtz K. The prevalence of PD in a nutritionally deficient rural population in China. *Acta Neurol Scand* 2005; 112(1): 29-35.

ANEXOS

ANEXO A – CERTIFICADOS

COMISIÓN DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN SANITARIA DEL H.U.V. MACARENA



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN MACARENA Y ÁREA

D. MIGUEL ÁNGEL RICO CORRAL, COMO PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN SANITARIA DEL ÁREA HOSPITALARIA VIRGEN MACARENA DE SEVILLA,

CERTIFICA:

Que esta Comisión en sesión celebrada el 19 de mayo de 2010 ha evaluado y aprobado del estudio titulado " Estudio del perfil proteómico del LCR en enfermos de Parkinson y búsqueda de neurotoxinas " presentado por el Dr. Emilio Fernández Espejo, catedrático de Fisiología, doctor en Medicina, Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Y para que conste firmo el presente documento en Sevilla, a 19 de mayo de 2010



Fdo: Miguel Ángel Rico Corral

ÉTICO COMITÉ DE EXPERIMENTACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA



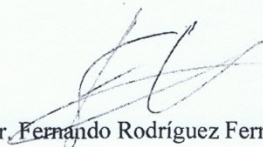
A quien pueda interesar:

El Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Sevilla, habiendo examinado el Proyecto “Estudio del perfil proteómico del líquido cefalorraquídeo en enfermos de Parkinson y búsqueda de neurotoxinas” presentado por D. Emilio Fernández Espejo emite el siguiente informe,

El proyecto cumple los requisitos exigidos para experimentación en sujetos humanos y en animales, y se ajusta a las normativas vigentes en España y en la Unión Europea.

Sevilla, a 27 de mayo de 2010.

EL PRESIDENTE DEL COMITE,

Fdo.: Prof. Dr.  Fernando Rodríguez Fernández.

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Emilio Fernández Espejo
Catedrático de Universidad
Departamento de Fisiología Médica

Juan Antonio Flores Corbero
Profesor ayudante doctor
Departamento de Fisiología Médica

Angel Martín de Pablo
Profesor asociado clínico
Departamento de Fisiología

En relación con la documentación de fecha 21 de junio de 2010, en la que D. Emilio Fernández Espejo solicita autorización para desarrollar conjuntamente el proyecto de investigación "Estudio del perfil protónico del LCR en enfermos de Parkinson y búsqueda de neurotoxinas" entre la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla y el Hospital Virgen Macaren, este Vicerrectorado de Investigación da su conformidad a la citada participación conjunta.

Manuel García León
Secretario
Departamento de Fisiología

Manuel García León
Estudiante de Medicina
Departamento de Fisiología



EL VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN,

Fdo.: Manuel García León

Sevilla, 28 de junio de 2010
Su referencia,
Nuestra referencia, Sección Investigación/Gd
Asunto, Autorización Proyecto

Destinatario
D. EMILIO FERNÁNDEZ ESPEJO
Departamento de Fisiología Médica
FACULTAD DE MEDICINA



DPTO. DE FISIOLÓGÍA MÉDICA
Y BIOFÍSICA
FACULTAD DE MEDICINA

SERVICIO DE INVESTIGACIÓN
Pabellón de Brasil, Avd. de las Delicias, 41013-SEVILLA
TELÉFONO: 954488125-26-40// FAX: 954488127
www.investigacion.us.es

ANEXO B – CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO - INFORMACIÓN AL PACIENTE

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

Naturaleza:

Los objetivos del trabajo son:

1) Evaluar tanto en enfermos de Parkinson (con diagnóstico sintomatológico y SPECT DatScan positivo) como sujetos control no enfermos de EP, los niveles de los distintos componentes del sistema antioxidante del glutatión, y las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa. El sistema de glutatión engloba a glutatión total, glutatión oxidado y reducido, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión S transferasa. El fin es determinar el perfil de moléculas antioxidantes tanto en suero como LCR en la enfermedad de Parkinson,

2) Evaluar la autooxidación del LCR y del suero mediante los niveles de AOPP y de hidroperóxidos lipídicos, en enfermos y controles, así como otros indicadores de oxidación.

3) Evaluar la capacidad antioxidante total de los fluidos estudiados.

En el estudio se recogerán algunos datos de su historia clínica. Igualmente se le extraerán 5 ml de LCR mediante una punción lumbar con aguja fina, del modo habitual, y 5 ml de sangre mediante venopunción en la vena antecubital de la cara anterior del antebrazo, también de modo usual. Se trata sólo de un estudio, por lo que no deberá hacer nada que no forme parte del tratamiento normal que recibiría si no participara, salvo la extracción de LCR y sangre que se realizará por su neurólogo o anestesista en las dependencias hospitalarias.

La investigación está organizada por los siguientes doctores: Dr. Emilio Fernández Espejo, catedrático de Fisiología, doctor en Medicina, Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla. Dr. José Manuel García Moreno, neurólogo, Servicio de Neurología del Hospital Virgen Macarena de Sevilla. Dra. Carolina Méndez Lucena, neuróloga, licenciada en Medicina, Servicio de Neurología del Hospital Virgen Macarena de Sevilla. Dr. Angel Martín de Pablos, anestesista, Servicio de Anestesia y Reanimación del Hospital Virgen Macarena de Sevilla, profesor asociado del Departamento de Cirugía de la Universidad de Sevilla.

Importancia:

No existe ninguna ventaja inmediata, pero esperamos que la información obtenida ayude a mejorar los conocimientos científicos sobre los factores proteicos y tóxicos que afectan al desarrollo de la enfermedad de Parkinson. Estos conocimientos podrían permitir mejorar la atención y el tratamiento de pacientes como usted en un futuro. Por participar en este estudio no recibirá usted ningún tipo de compensación económica.

Implicaciones para el donante/paciente:

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

Riesgos de la investigación para el donante/paciente:

Su médico no cambiará la atención ni el tratamiento que recibe, por lo que no corre ningún riesgo al participar en el estudio salvo el derivado de la extracción de LCR por medio de punción lumbar.

A veces la extracción de líquido cefalorraquídeo puede ocasionar cefalea (25% de los casos) que requerirá reposo durante 48 horas, dolor radicular por punción de alguna raíz que dura poco tiempo (minutos), o causar un hematoma subcutáneo en el sitio de extracción. La extracción de sangre también producir hematoma subcutáneo en el sitio de punción.

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con el Dr. Emilio Fernández Espejo (Tel. 954 55 65 84) o el Dr. José Manuel García Moreno (Tel. 955 00 8 681)

CONSENTIMIENTO INFORMADO - CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

Análisis del estrés oxidativo en líquido cefalorraquídeo y búsqueda de neurotoxinas en enfermos de Parkinson

Yo:

.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)
- He podido hacer preguntas sobre el estudio Análisis del estrés oxidativo en líquido cefalorraquídeo y búsqueda de neurotoxinas en enfermos de Parkinson
- He recibido suficiente información sobre el estudio Análisis del estrés oxidativo en líquido cefalorraquídeo y búsqueda de neurotoxinas en enfermos de Parkinson.

He hablado con el profesional sanitario informador:

.....

- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.

- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- **Deseo** ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Si

No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el *proyecto titulado*:

Análisis del estrés oxidativo en líquido cefalorraquídeo y búsqueda de neurotoxinas en enfermos de Parkinson

Firma del paciente

Firma del profesional

(o representante legal en su caso)

sanitario informador

Nombre y apellidos

Nombre y apellidos:

Fecha:

Fecha:

PUBLICACIONES DERIVADAS DEL TRABAJO DOCTORAL

El trabajo doctoral ha dado lugar a dos publicaciones, de cuartil 1 y decil 1 respectivamente, y con media de factor de impacto de 5,37, que se presentan a continuación:

AUTORES: Angel Martín de Pablos, Antonio Córdoba Fernández, Emilio Fernández Espejo

TÍTULO: Analysis of neurotrophic and antioxidant factors related to midbrain dopamine neuronal loss and brain inflammation in the cerebrospinal fluid of the elderly

REVISTA: *Experimental Gerontology*, 2018, 110: 54-60.

FACTOR DE IMPACTO = 3,34.

ISSN: 0532-5565

POSICIÓN EN GERIATRICS & GERONTOLOGY 12/49 (Q1)

AUTORES: Ángel Martín de Pablos, José Manuel Garcia-Moreno, Emilio Fernández

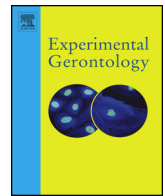
TÍTULO: Does the Cerebrospinal Fluid Reflect Altered Redox State But Not Neurotrophic Support Loss in Parkinson's Disease?

REVISTA: *Antioxid. Redox Signal.*, 2015, 23(11): 893-898. PMID: 26263410

FACTOR DE IMPACTO = 7,407.

ISSN: 1523-0864

POSICIÓN EN ENDOCRINOLOGY & METABOLISM 5/122 (D1)



Analysis of neurotrophic and antioxidant factors related to midbrain dopamine neuronal loss and brain inflammation in the cerebrospinal fluid of the elderly

Angel Martin-de-Pablos^{a,b}, Antonio Córdoba-Fernández^c, Emilio Fernández-Espejo^{a,*}

^a Laboratorio de Neurofisiología y Neurología Molecular, Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Universidad de Sevilla, E-41009 Sevilla, Spain

^b Departamento de Cirugía, Universidad de Sevilla, E-41009 Sevilla, Spain

^c Departamento de Podología, Universidad de Sevilla, E-41009 Sevilla, Spain

ARTICLE INFO

Section Editor: Christian Humpel

Keywords:

Aging
CSF
Antioxidant
Trophic factor
Ferritin
Glutathione-S-transferase
BDNF

ABSTRACT

Midbrain dopamine neuronal loss and neuroinflammation are two phenomena that are associated with brain senescence. Neurotrophic factor changes and oxidative stress could subserve these phenomena. Aging-related brain changes can be well monitored through the cerebrospinal fluid (CSF). The objective was to analyze neurotrophic and oxidative parameters that could be related to midbrain dopamine neuronal loss or brain inflammation in the CSF of elderly subjects: 1) levels of the dopaminotrophic factors BDNF, GDNF, persephin, and neurturin, 2) levels of the proinflammatory factors TGFβ₁ and TGFβ₂; 3) activity of main antioxidant enzymes (catalases, glutathione-peroxidase, glutathione-reductase, glutathione-S-transferases, peroxiredoxins, and superoxide-dismutases), 4) ferritin content, antioxidant protein which reduces reactive free iron, and 5) antioxidant potential of the cerebrospinal fluid. ELISA and PAO tests were used. Subjects were also evaluated clinically, and the group of old subjects with mild cognitive impairment was studied separately. The findings indicate that normal elderly CSF is devoid of changes in either dopaminotrophic or proinflammatory factors. The antioxidant efficacy is slightly reduced with normal aging, through a reduction of glutathione-S-transferase activity in people older than 74 years ($p < 0.05$). However old people with mild cognitive impairment show reduced BDNF levels, and stronger signs of oxidative stress such as low antioxidant potential and glutathione-S-transferase activity ($p < 0.05$). To sum up, the present study demonstrates that, in CSF of normal senescence, dopaminotrophic factors and proinflammatory TGF-family ligands are not affected, and antioxidant efficacy is slightly reduced. CSF of elderly subjects with mild cognitive impairment shows more oxidative and trophic changes that are characterized by reduction of BDNF content, glutathione-S-transferase activity, and antioxidant potential.

1. Introduction

Midbrain dopamine neuronal loss and inflammation are two phenomena that are associated with brain senescence. Thus, midbrain dopamine cell death is enhanced with aging, and this cellular decline has been estimated to affect 4–7% of dopamine substantia nigra neurons per decade (Scherman et al., 1989; Fearnley and Lees, 1991; Budni et al., 2015). Brain inflammation seems to be associated to activation of microglia due to senescence (Godbout and Johnson, 2004; Pertusa

et al., 2007; Ritzel et al., 2015). Neurotrophic factor deficit and oxidative stress could subserve these aging-associated phenomena (Barja, 2014; Budni et al., 2015).

Regarding neurotrophic factors that are related to midbrain dopamine neurons, the survival of this neuronal population is critically dependent on the “dopaminotrophic” factors of the glial cell line-related ligands family (GFL family), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). The GFL family includes ligands such as glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), neurturin, and persephin (Lin et al., 1993;

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BMI, body mass index; BMJ, British Medical Journal; CSF, cerebrospinal fluid; ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor; GFL, glial cell line-related family ligands; GPX, glutathione-peroxidase; GR, glutathione-reductase; GSH, glutathione; GST, glutathione-S-transferase; IADL, Instrumental activities of daily living; MCI, mild cognitive impairment; MMSE, Mini-Mental State Examination test; PAO, antioxidant potential; PRDX, peroxiredoxins; RAVLT, Rey verbal learning test; SOD, superoxide dismutase; TGF, transforming-growth factor; TGFβ₁, transforming-growth factor beta 1; TGFβ₂, transforming-growth factor beta 2; WHO, World Health Organization

* Corresponding author at: Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Universidad de Sevilla, Facultad de Medicina, E-41009 Sevilla, Spain.

E-mail address: efespejo@us.es (E. Fernández-Espejo).

<https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.05.009>

Received 18 November 2017; Received in revised form 10 April 2018; Accepted 14 May 2018
0531-5565/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Kriegelstein et al., 1998; Rosenblad et al., 1999; Airaksinen and Saarma, 2002; Fjord-Larsen et al., 2005). BDNF is important for the development and survival of dopaminergic substantia nigra neurons (Mogi et al., 1999). BDNF, apart from its dopaminotrophic effect, is also critical for the maintenance of other populations of neurons which mediate cognitive processes such as learning and memory (Korhonen et al., 1998; Albrecht et al., 2006; Silhol et al., 2008).

Brain inflammation could be exacerbated, at least in part, by trophic factors of the transforming-growth factor family (TGF family), such as TGF β ₁ and TGF β ₂. These ligands are released by activated microglia, and they are considered as proinflammatory factors (Unsicker et al., 1991; Wyss-Coray et al., 2001; Hirsch and Hunot, 2009; Hirsch et al., 2012). In addition, BDNF is also related to neuroinflammation. This factor can be released by activated microglia, and the release of BDNF can, in turn, activate microglia and inflammation (Zhang et al., 2014). Hence BDNF acts as a powerful pro-inflammatory cytokine (Zhang et al., 2014). Accordingly, BDNF seems to be a dual compound: BDNF excess is proinflammatory, but BDNF deficit reduces its neurotrophic efficacy. However, this role of BDNF in neuroinflammation has been put into question, because recently some authors have attributed anti-inflammatory effects to excess amounts of BDNF (Lai et al., 2018). They propose that BDNF is released by activated microglia, but it participates in endogenous cross-talks between astrocytes and microglia to regulate anti-inflammatory actions rather than pro-inflammation.

Neuronal death and inflammation are tightly linked to oxidative stress (Navarro-Yepes et al., 2014; Barja, 2014), and it is widely accepted that brain aging could be accelerated by the damaging action of reactive oxygen species (Harman, 1956; Gerschman et al., 1964; Barja, 2014). The body possesses antioxidant defenses which scavenge free radicals and minimize their effects, but it seems that these defenses reduce their efficacy with aging (Jenner, 2003; García-Moreno et al., 2013; Navarro-Yepes et al., 2014). As a consequence, reactive species could participate in the development of cell senescence (Afanasyev, 2010; Barja, 2014). In the brain, many antioxidant molecules are known to be affected with senescence. Thus, nocturnal secretion of melatonin along with levels of coenzyme Q and ascorbate are reduced (Spindler et al., 2009; Escames et al., 2010; Phillipson, 2014). In addition, melatonin hypoactivity down-regulates physiological activity of antioxidant molecules such as superoxide-dismutases (SOD), catalases and glutathione (GSH) (Martin et al., 2000; Phillipson, 2014). In this context, decreased GSH has already been found in old people (Phillipson, 2014), although changes in SOD and catalase activity are far from clear (Carrillo et al., 1992; Okabe et al., 1996). Oxidative stress can be also caused by accumulation of reactive metals such as iron or copper. The iron storage protein ferritin, which exerts an anti-oxidant protective role reducing reactive free iron, could be affected in the brain with aging (Dexter et al., 1990; Kuiper et al., 1994; Bradbury, 1997).

Aging-related changes in the central nervous system can be well monitored through the cerebrospinal fluid (CSF), a fluid in close contact with nerve tissue and considered as a good witness of brain processes (Kroksveen et al., 2011). The objective of this study was to analyze neurotrophic and oxidative parameters that could be related to mid-brain dopamine neuron loss or neuroinflammation in the CSF of elderly subjects: 1) levels of the dopaminotrophic factors BDNF, GDNF, persephin, and neurturin, 2) levels of the proinflammatory factors TGF β ₁ and TGF β ₂; 3) activity of main antioxidant enzymes (catalases, glutathione-peroxidase, glutathione-reductase, glutathione-S-transferases, peroxiredoxins, and superoxide-dismutases), 4) levels of ferritin, iron storage protein, and 5) antioxidant potential of the fluid (PAO test).

2. Material and methods

2.1. Study participants

The cross-sectional study was carried out in Hospital Macarena,

Sevilla, Spain. Subjects were recruited from volunteers subjected to intradural anesthesia in the Service of Surgery of Hospital Macarena. All of them were operated from hip fracture, umbilical hernia or anal surgery. Anesthesia and the surgery themselves had no impact on the CSF parameters to be analyzed. Clinical information was gathered from each patient: age, sex, body weight, height, body mass index (BMI), hypertension, hyperlipidemia, coffee drinking, smoking, alcohol use, taking of vitamins A/E/C supplement, and thyroid dysfunction (hypo- or hyper-thyroidism). Hypertension was diagnosed when blood pressure repeatedly (two measures fifteen days apart) exceeded 140 mm Hg (systolic) and/or 90 mm Hg (diastolic) or when a subject was taking antihypertensive medication to control hypertension. Hyperlipidemia was diagnosed when blood cholesterol levels were higher than 200 mg/dl, triglycerides content was over 250 mg/dl and HDL levels were lower than 35 mg/dl, or subject were taking drugs for lowering lipidemia. Use of vitamins was defined as daily intake of either Vitamin A or Vitamin E or Vitamin C. Drinking coffee was defined as daily intake of at least 300 ml of coffee. Smoking was defined as current smoker who consumed cigarettes on a daily basis. Alcohol use was defined as drinking > 210 g of alcohol per week.

Mild cognitive impairment (MCI) was also evaluated by a psychiatrist of the Service of Psychiatry of the hospital. Cognition was modeled using the Rey verbal learning test (RAVLT, Spanish version), which is very sensitive in distinguishing control and MCI patients through the evaluation of verbal cognition (Ryan and Geisser, 1986; Estévez-González et al., 2003), and the Spanish version of the Mini-Mental State Examination test (MMSE), which allows evaluating different cognitive aspects (Folstein et al., 1975; Lobo et al., 1979; Manubens et al., 1998). The cutoff for the Spanish version of the MMSE test was 23/24 (range, 0–35). In addition, activities of daily living (ADL) were assessed, because many studies point out that people in the preclinical stage of dementia and mild cognitive impairment patients have instrumental ADL disabilities (Perneczky et al., 2006; Jefferson et al., 2008). The Instrumental activities of daily living (IADL) were evaluated with the Spanish versions of the Lawton-Brody and Pfeffer Scales, which investigate the level of independence in daily living tasks (Lawton and Brody, 1969; Pfeffer et al., 1982; Olazarán et al., 2005; Montejo-Carrasco et al., 2012). The cutoff for the Lawton-Brody scale was 19/20 (range, 0–25), and that for the Pfeffer scale, which allows a more accurate discrimination of dementia, was 6/7 (range, 0–33). RAVLT and MMSE tests and Lawton-Brody and Pfeffer scales were administered to all included participants.

Individuals suffering from liver, renal and cardiac dysfunctions, malabsorption, morbid obesity, autoimmune diseases, rheumatoid arthritis, AIDS, dementia or Alzheimer disease (AD), and infectious conditions were excluded from the study. Oxidative stress markers in the CSF may be altered in such conditions (Martín de Pablos et al., 2015). Rheumatoid arthritis was defined based on WHO criteria. Morbid obesity was diagnosed when BMI was higher than 35 kg/m².

2.2. CSF collection and analysis

CSF was collected through lumbar puncture. Three ml of CSF were collected and stored in polypropylene tubes (Eurotube, Spain) protected by the light, and rapidly aliquoted, coded and frozen at –80 °C for further studies. A half ml collection in a glass tube was employed to observe the absence of traumatic puncture and to quantify red cells before storing. CSF with excess of red cells was discarded (> 500 red cells/microL). Fresh, never before thawed, 0.5 ml aliquots for each subject were analyzed on 96-well plates in the same analytical run for this study to minimize run to run and reagent kit lot sources of variation. One fresh CSF aliquot was used for measuring routine parameters in the Hospital laboratory settings. These parameters included total protein content, glucose, pH, density, and number of leukocytes per microliter. Density was measured at 37 °C in a Density Meter that displayed density to the fourth decimal point, and was accurate to

0.00003 g/ml.

2.3. ELISA measurement

CSF aliquots were unfrozen and sonicated with homogenizing solution (150 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.6 μM leupeptin, 1% Triton X-100, pH 7.4). For measuring CSF levels of GDNF, persephin, neurturin, BDNF, TGFβ₁ and TGFβ₂, commercial kits were used (GDNF E_{max}[®] ImmunoAssay System, ProOmega, USA; Human Persephin ELISA kit, Wuhan EIAab Science Co. Ltd., China; Human Neurturin ELISA kit, Wuhan EIAab Science Co. Ltd.; Human BDNF ELISA Kit, Boster Biological Tech, USA; TGFβ₁E_{max}[®] Immunoassay System, Promega; TGFβ₂ Human ELISA kit, Abcam, USA), following manufacturer's instructions.

Commercially available ELISA kits were used for evaluating the activity of the antioxidant enzymes glutathione-reductase (GR), glutathione-peroxidase (GPx), glutathione-S-transferases (GST), catalases, and superoxide-dismutases (SOD). ELISA kits were purchased from Bioxytech (Oxis Internacional Inc., Portland, USA; GR-340 assay kit); and Biovision (GPx activity kit 762-100, GST Assay kit K263-100; Catalase activity Assay kit; SOD activity kit K335-100) The GR-340 assay is based on the oxidation of NADPH to NADP⁺ catalyzed by a limiting concentration of glutathione-reductase. One GR activity unit is defined as the amount of enzyme catalyzing the reduction of 1 μmol of GSSG per minute at pH 7.5 and 25 °C. Biovision glutathione-peroxidase assay kit measures glutathione-peroxidase activity through a coupled reaction with GR. The GST colorimetric activity assay kit is based upon the GST-catalyzed reaction between GSH and CDBN, GST substrate. As for catalase, this enzyme reacts with hydrogen peroxide to produce water and oxygen, and the unconverted hydrogen peroxide reacts with the probe to produce a product that can be measured at 570 nm. The inhibition activity of SOD of the rate of the reduction with a superoxide anion is measured by the SOD activity assay kit. Finally, peroxiredoxin activity was measured following the HRP method, based on measurement of peroxide-dependent peroxiredoxin activity with hydrogen peroxide using horseradish peroxidase competition assay (Nelson and Parsonage, 2011). Data are given as percent reduction in absorbance versus control (adult people's CSF was considered as control or 100%). Finally, CSF ferritin levels were also quantified by ELISA (Ferritin ELISA DB59111, IBL International GMBH, Germany). This ELISA methodology is usually employed in the laboratory (Martín de Pablos et al., 2015).

2.4. PAO test

Antioxidant potential of CSF was measured with the PAO test (test kit for potential antioxidant, Jaica, Nikken SEII Ltd., Japan). In the PAO assay kit, an easy and convenient method to measure antioxidant capacity is provided. Utilizing the reduction of cupric ion (Cu⁺⁺ to Cu⁺), antioxidant potential of samples can be detected. The PAO test can detect hydrophilic antioxidants such as Vitamin C, glutathione, and hydrophobic antioxidants such as Vitamin E.

2.5. Statistics and ethics

We obtained CSF from 61 subjects, classified into four age groups: subjects from 18 to 49 years ("younger adults"), 50 to 64 years ("middle-aged adults"), from 65 to 74 years ("early aging"), and over 74 years old ("advanced aging"). Qualitative variables were compared with the Chi-square test. Regarding quantitative measures, one-way ANOVA was used for group comparisons, followed by post-hoc Newman-Keuls test. Two groups were compared with the Student's *t*-test. Normalization was verified with the Shapiro-Wilk test. If data were not found to be normally distributed, the non-parametric Mann-Whitney *U* test was used for group comparisons. Correlations between variables were analyzed with the Pearson test. Informed consent forms under a protocol approved by the University of Seville and Macarena

Table 1

Clinical features of the study population.

Group	Adults		Elderly	
	Younger adults	Middle-aged adults	Early aging	Advanced aging
Age groups (years, number of subjects)	18–49 (n = 12)	50–64 (n = 17)	65–74 (n = 13)	> 74 (n = 19)
Mean age (years)	39.7 ± 5	57.3 ± 4	68.1 ± 5	80.1 ± 3
Male/female	6/6	10/7	4/9	10/9
Smoker	58%	23.5%	46%	5%
Alcohol drinker	0%	11.7%	15.3%	5%
Hypertension	0%	11.7%	40%*	42.2%*
Hyperlipidemia	8%	17.6%	15.3%	22%
Anxiety/depression	0%	0%	7.6%	16%
Thyroid dysfunction	8%	5.8%	7.6%	11%
MCI	0%	0%	0%	36.8% [#]

Mean ± SEM, *p < 0.05 versus younger adults and middle-aged adults;

[#]p < 0.05 versus younger adults, middle-aged adults and early aging subjects (Chi-square test). Abbrev.: MCI, Mild cognitive impairment.

Hospital internal ethics and scientific boards were obtained from all the subjects, and the subjects' consent was obtained according to the Declaration of Helsinki (BMJ 1991; 302: 1194).

3. Results

3.1. Clinical characteristics of the population

The clinical features of the studied population are shown in Table 1. Some significant differences were observed in the elderly population relative to younger people. Thus hypertension was more prevalent in elderly subjects (p < 0.05, Chi-square), including both "early-aging" and "advanced-aging" groups. Mild cognitive impairment or MCI was more frequent in people with advanced aging (older than 74 years) relative to the remainder groups (p < 0.05, Chi-square). Old people with MCI was studied as a different group (n = 7, "advanced aging with MCI" group), in order to discern statistical differences in CSF parameters due to MCI. The final "advanced-aging" group (without MCI) was composed of 12 subjects.

3.2. General clinical parameters of CSF are not modified with aging

Clinical CSF parameters including total protein content, glucose, pH, density, and number of leukocytes per microliter were not found to be modified with aging, as shown in Table 2. No differences were observed among groups.

3.3. BDNF, GDNF, persephin, TGFβ₁ and TGFβ₂ are not altered with aging in CSF except for BDNF in the elderly with mild cognitive impairment

Statistics did not reveal significant differences on the neurotrophic factors BDNF, GDNF, persephin, TGFβ₁ and TGFβ₂ in CSF of younger adults, middle-aged adults and normal elderly people, as shown in Table 3. Neurturin was undetectable, likely because its level is below the detection range of the Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). BDNF, not other neurotrophic factor, was observed to be significantly reduced in "advanced-aging" people with mild cognitive impairment (p < 0.001, Student), as shown in Table 3. Individual CSF BDNF values are represented in Fig. 2.

3.4. CSF activity of the antioxidant enzymes glutathione-peroxidase, glutathione-reductase, catalases, superoxide-dismutases, and peroxiredoxins is not modified with aging

The activity of the antioxidant enzymes glutathione-peroxidase

Table 2
Clinical parameters in the CSF of all groups.

Group	Younger adults	Middle-aged adults	Early aging	Advanced aging	Advanced aging with MCI
Age group (years)	18–49	50–64	65–74	> 74	> 74
CSF total protein (mg/dl)	16.5 ± 2	16.4 ± 2	15.3 ± 1.9	18.2 ± 1.3	18.8 ± 1.8
CSF glucose (mg/dl)	48.4 ± 9	50.9 ± 10	42.6 ± 19	45.6 ± 14	43.4 ± 15
CSF pH	7.2 ± 0.1	7.2 ± 0.2	7.3 ± 0.1	7.3 ± 0.1	7.2 ± 0.05
CSF density	1.00059 ± 0.0001	1.00058 ± 0.0001	1.00061 ± 0.0001	1.00061 ± 0.0001	1.00058 ± 0.0001
CSF leukocytes/μl	2.1 ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.6 ± 0.2	2.7 ± 0.2	2.6 ± 0.2

Mean ± SEM. Abbrev.: CSF, cerebrospinal fluid; MCI, mild cognitive impairment.

(GPx), glutathione-reductase (GR), catalases, superoxide-dismutases (SOD), and peroxiredoxins (PRDX) was measured. Statistical analysis did not show differences between younger adults, middle-aged adults and the elderly, as illustrated in Table 4. No significant differences were found in elderly groups with MCI.

3.5. Activity of glutathione-S-transferase is reduced in people older than 74 years, whether or not they suffer from mild cognitive impairment

One-way ANOVA revealed a significant effect of age on the activity of glutathione-S-transferase ($F_{3, 69} = 2.8$; $p < 0.05$), excluding the “advanced aging with MCI” group. GST activity was found to be significantly reduced in persons older than 74 years without MCI ($p < 0.05$ versus the remainder groups, Newman-Keuls), as shown in Fig. 1. GST activity was also found to be significantly reduced in old persons with mild cognitive impairment relative to younger adults, middle-aged adults and early-aging subjects ($p < 0.05$, Student's *t*-test), as shown in Fig. 1. No significant correlations were found between age (years) and GST activity.

3.6. CSF ferritin and antioxidant potential are not modified with normal aging, but CSF antioxidant potential, not ferritin, is reduced in the elderly with mild cognitive impairment

Ferritin content did not show significant differences between younger adults, middle-aged adults and elderly subjects (Table 5). CSF ferritin content was also found to be normal in “advanced aging with MCI” group. Antioxidant potential of the fluid, as measured with the PAO test, was not found to be different among younger and middle-aged adults as well as elderly people. The PAO test value was significantly reduced in advanced-aging persons with mild cognitive impairment ($p < 0.05$ versus the other groups, Student's *t*-test), as shown in Table 5. Individual values of the PAO test in “advanced-aging” subjects without or with MCI are illustrated in Fig. 2.

4. Discussion

Midbrain dopamine neuronal loss and neuroinflammation are two phenomena that are associated with brain senescence. It is well-known that neurotrophic factor changes and oxidative stress could subserve, at

least in part, these aging-associated phenomena (Barja, 2014; Budni et al., 2015).

Midbrain dopamine neuron survival is critically dependent on members of the GFL family and BDNF (Scherman et al., 1989; Fearnley and Lees, 1991; Silhol et al., 2008; Budni et al., 2015). The GFL family includes ligands such as glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), neurturin, and persephin (Lin et al., 1993; Kriegstein et al., 1998; Rosenblad et al., 1999; Airaksinen and Saarma, 2002; Fjord-Larsen et al., 2005). The present study, which is based on the analysis of CSF content of these ligands, did not reveal changes with aging. The decline of dopamine nigral neurons with aging has been estimated to affect 4–7% of neurons per decade (Scherman et al., 1989; Fearnley and Lees, 1991; Budni et al., 2015), but our findings would indicate that GFL-family factors are not involved. On the other hand, CSF content of BDNF, another dopaminotrophic factor, was found not to be modified in normal senescence too. It can be concluded that the decline of dopamine nigral neurons with aging is not tied to changes in the GFL-family ligands or BDNF in the CSF.

However, it is of note that the elderly with mild cognitive impairment shows reduced BDNF content in the CSF. This trophic ligand is known to be critical for the maintenance of neurons which mediate cognitive processes, apart from dopamine neurons (Silhol et al., 2008; Korhonen et al., 1998; Albrecht et al., 2006). BDNF deficit has already been proposed to accelerate the decline of cognitive processes such as learning and memory (Korhonen et al., 1998; Albrecht et al., 2006; Silhol et al., 2008). The present study would corroborate these findings. On the other hand, CSF levels of the GFL-family ligands GDNF, persephin and neurturin were observed not to be modified in subjects with MCI. In this context, other authors have reported that GDNF is found to be enhanced in the CSF of patients with AD (Straten et al., 2009), although negative results have been also reported (Blasko et al., 2006).

Regarding brain inflammation, CSF levels of TGFβ₁ and TGFβ₂ were not affected with aging. Both factors, that are known to be released by activated microglia, have been related to inflammatory processes in neurodegenerative diseases (Zetterberg et al., 2004; Hirsch and Hunot, 2009; Hirsch et al., 2012). CSF BDNF excess, that has been related to pro-inflammation (Zhang et al., 2014), was not detected. Hence if there is brain inflammation with aging, this process would not be associated with changes in TGF-family ligands or BDNF.

The present study also reveals that the antioxidant efficacy of the

Table 3
Levels of GDNF, persephin, neurturin, TGFβ₁, and TGFβ₂ in the CSF of all groups.

Group	Younger adults	Middle-aged adults	Early aging	Advanced aging	Advanced aging with MCI
Age group (years)	18–49	50–64	65–74	> 74	> 74
CSF BDNF (pg/ml)	272.3 ± 21	289.8 ± 22	271.1 ± 25	308.3 ± 15	231.5 ± 18**
CSF GDNF (pg/100 μl)	75.8 ± 5	76.2 ± 4.6	83.3 ± 18	72.4 ± 13	71.2 ± 3.3
CSF Persephin (pg/100 μl)	101.1 ± 6.1	109.4 ± 6.5	104.3 ± 16	112.9 ± 13	101.2 ± 5.8
CSF Neurturin	nd	nd	nd	nd	nd
CSF TGFβ ₁ (pg/100 μg protein)	50.6 ± 9	51.3 ± 10	44.2 ± 4	54.6 ± 9	53.6 ± 8
CSF TGFβ ₂ (pg/ml)	164.5 ± 22	156.6 ± 24	171.2 ± 30	101.2 ± 23	172.4 ± 22

Mean ± SEM. ** $p < 0.01$ vs. younger adults, middle-aged adults, early-aging subjects, and advanced-aging group (Student's *t*-test). Abbrev.: CSF, cerebrospinal fluid; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor; TGFβ₁, Transforming growth factor β₁; TGFβ₂, Transforming growth factor β₂; nd, no detectable; MCI, Mild cognitive impairment.

Table 4

Activity of the antioxidant enzymes glutathione-peroxidase, glutathione-reductase, catalases, superoxide-dismutases, and peroxiredoxins in the CSF of all groups.

Group	Younger adults	Middle-aged adults	Early aging	Advanced aging	Advanced aging with MCI
Age group (years)	18–49	50–64	65–74	> 74	> 74
CSF GPx (mU/ml)	245.5 ± 21	273.2 ± 24	243.6 ± 34	278.4 ± 35	246.5 ± 36
CSF GR (mU/ml)	12.1 ± 1.2	10.3 ± 1.5	8.4 ± 1	14.2 ± 2	9.3 ± 1.2
CSF catalases (mU/ml)	2.2 ± 0.6	1.8 ± 0.5	2.3 ± 0.9	2.7 ± 1	1.5 ± 0.6
CSF SOD (U/ml)	0.17 ± 0.1	0.18 ± 0.1	0.15 ± 0.1	0.14 ± 0.2	0.14 ± 0.1
CSF PRDXs (ΔActrl - ΔA%)	0%	0%	1%	0%	0%

Mean ± SEM. Abbrev.: CSF, cerebrospinal fluid; GPx, glutathione-peroxidase; GR, glutathione-reductase; SOD, superoxide-dismutases; PRDXs, peroxiredoxins; ΔActrl - ΔA %, percent reduction in absorbance versus control (all adults considered as controls).

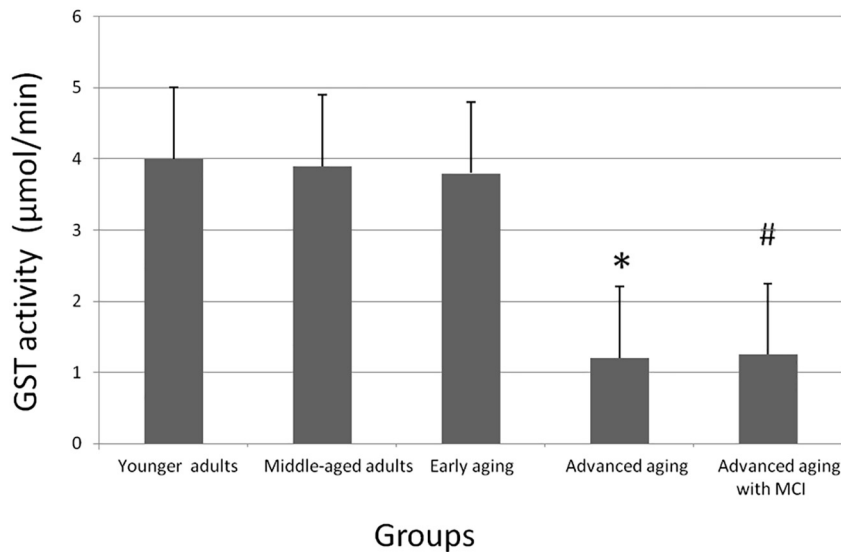


Fig. 1. Glutathione-S-transferase activity (μmol/min) in the CSF of all studied groups. Mean ± SEM, **p* < 0.01 versus younger adults, middle-aged adults and early-aging groups (Newman-Keuls test); #*p* < 0.05 versus younger adults, middle-aged adults and early-aging subjects (Student's *t*-test). Abbrev.: GST, glutathione-S-transferase; CSF, cerebrospinal fluid; MCI, mild cognitive impairment.

Table 5

Ferritin content and potential antioxidant in the CSF of all groups.

Group	Younger adults	Middle-aged adults	Early aging	Advanced aging	Advanced aging with MCI
Age group (years)	18–49	50–64	65–74	> 74	> 74
CSF ferritin (ng/ml)	5.5 ± 1.1	5.4 ± 1.1	5.4 ± 1	5.1 ± 1.2	5.7 ± 0.4
PAO test (μmol/cl of Cu ⁺ formed)	12.78 ± 1	12.26 ± 1	12.21 ± 1	12.62 ± 1	10.45 ± 1*

Mean ± SEM. **p* < 0.05 relative to younger adults, middle-aged adults, early-aging subjects, and advanced-aging group (Student's *t*-test). Abbrev.: MCI, Mild cognitive impairment.

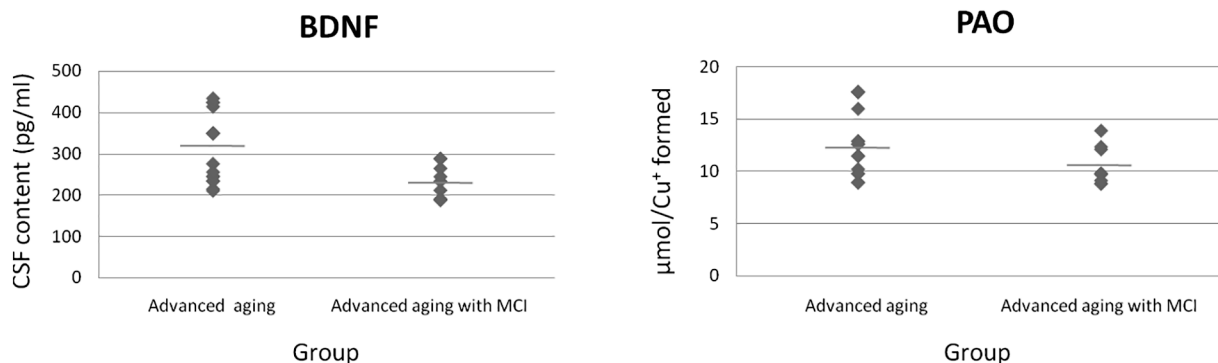


Fig. 2. Individual values of CSF content of brain-derived neurotrophic factor (pg/ml) and PAO test measure (μmol/cl of Cu⁺ formed) in subjects with advanced aging (> 74 years old), without or with mild cognitive impairment. The line represents the mean value of the population. Abbrev.: BDNF, brain-derived neurotrophic factor; MCI, Mild cognitive impairment.

CSF seems to be slightly affected with normal aging. CSF oxidative state was normal, as evaluated through the activity of superoxide anion and hydrogen peroxide scavengers, glutathione-S-transferase, ferritin levels and antioxidant potential of the fluid. Our findings are in disagreement

with the theory that aging process is associated with a higher oxidative stress level (Ji, 2001; Miles et al., 2004), or with increased superoxide-dismutase activity in the CSF (Hiramatsu et al., 1992). Furthermore, aging-related melatonin hypoactivity is supposed to down-regulate

physiological activity of antioxidant molecules such as superoxide-dismutases, catalases and glutathione (Martin et al., 2000; Phillipson, 2014), but CSF activity of these molecules were not found to be affected. In the oldest people (> 74 years old) only the activity of the antioxidant GST was found to be reduced. The main function of GST is to join glutathione (GSH) to electrophilic centers of toxic molecules, increasing their solubility and facilitating their excretion from the body (Mazzetti et al., 2015). In the brain and CSF, GSTs are cytosolic enzymes which are expressed by both neurons and astrocytes. The observed reduction in GST activity could indicate that the detoxifying activity of this family of enzymes is reduced. GST enzymes eliminate several xenobiotics: endogenous xenobiotics such as dopamine-quinones, hydroperoxides and lipid peroxides (Hayes et al., 2005; Josephy, 2010; Singhal et al., 2015); xenobiotic drugs such as psychoactive drugs, NOS inhibitors or cholinesterase inhibitors; and exogenous xenobiotics such as pesticides, carcinogens or insecticides (Board and Menon, 2013). These findings allow us to propose that advanced aging would be associated with a reduction of GST-mediated detoxifying efficacy.

Of note is that CSF of old people with MCI showed, apart from reduced BDNF, more oxidative alterations than normal subjects. Both CSF antioxidant potential, as measured through the PAO test, and GST activity were found to be reduced in subjects with mild cognitive impairment. In this context, age-related memory and cognitive decline has already been associated with a decrease in brain and plasma antioxidant levels and an increase in oxidative stress levels (Akbaraly et al., 2007; Rinaldi et al., 2003; Torres et al., 2011). An efficient antioxidant system may preserve the cognitive function in the elderly (Akbaraly et al., 2007; Rodrigues Siqueira et al., 2005), but it seems that this system is affected in old people with MCI. As regards antioxidant potential of the CSF, the PAO test represents the ability of the CSF sample to reduce cupric ions to cuprous ions. A diminished ability to reduce cupric ions might be due to changes in the main element of plasma defense to oxidation (vitamin C, vitamin E, bilirubin, uric acid, and glutathione). Regarding the specific change in GST activity, this enzymatic defect would also reduce detoxifying efficacy in elderly people with MCI, as explained. In this context, GST activity is known to be decreased in the CSF of AD patients, where antioxidation defenses are strongly affected (Lovell et al., 1998; Markesbery and Carney, 1999; Kimpara et al., 2000; Torres et al., 2011).

Finally, clinical CSF parameters such as total protein levels, glucose content, density, pH or leukocyte count are not found to be modified with normal aging or advanced-aging people with MCI, revealing that general biochemistry of the CSF is devoid of changes in the aging CSF. It is important to note that there are limitations to this study. The main limitations were based on the relatively small sample size and its composition, because the participants were highly selected. Another limitation is that an important percentage of the population without clinical signs of Alzheimer's disease has cerebral Alzheimer's pathology. Since CSF biomarkers of AD such as Amyloid- β 42 or tau were not analyzed in the present study, it is possible that some studied old subjects could suffer from preclinical AD pathology (Adamczuk et al., 2015). These aspects act negatively on the generalization of the results.

5. Conclusions

The present study indicates that dopaminotrophic factors that maintain the survival of midbrain dopamine neurons as well as proinflammatory TGF-family ligands are not affected in CSF of the elderly. Antioxidant efficacy is slightly affected in CSF with normal aging, because only those subjects older than 74 years (without cognitive impairment) present reduced activity of the antioxidant enzyme glutathione-S-transferase. The CSF of elderly subjects with mild cognitive impairment shows more oxidative and trophic changes such as reduced antioxidant potential, glutathione-S-transferase activity, and BDNF content.

Acknowledgements

This work was supported by grants to EFE from Junta de Andalucía, Spain (#BIO127), and Sociedad Andaluza de Neurología (#SUBAIA2015/006). The authors thank Silvia Castellano (University of Seville) for her excellent technical assistance; Dr. Lola Franco (Hospital Macarena, Sevilla) for her help with psychiatric evaluation; and Drs. Angel Rico and Antonio Ontanilla for allowing the use of the facilities of the Service of Surgery and Anesthesiology (Hospital Macarena, Sevilla). The authors are most grateful to all subjects who participated in this study. The authors declare that no competing financial interests exist.

References

- Adamczuk, K., Schaevebeke, J., Vanderstichele, H.M., Lilja, J., Nelissen, N., Van Laere, K., Dupont, P., Hilven, K., Poesen, K., Vandenbergh, R., 2015. Diagnostic value of cerebrospinal fluid A β ratios in preclinical Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 7 (1), 75.
- Afanas'ev, I., 2010. Signaling and damaging functions of free radicals in aging – free radical theory, hormesis and TOR. *Aging Dis.* 1, 75–88.
- Airaksinen, M.S., Saarma, M., 2002. The GDNF family: signaling, biological functions and therapeutic value. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 383–394.
- Akbaraly, N.T., Faure, H., Gourlet, V., Favier, A., Berr, C., 2007. Plasma carotenoid levels and cognitive performance in an elderly population: results of the EVA study. *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 62 (3), 308–316.
- Albrecht, D., García, L., Cartier, L., Kettlun, A.M., Vergara, C., Collados, L., Valenzuela, M.A., 2006. Trophic factors in cerebrospinal fluid and spinal cord of patients with tropical spastic paraparesis, HIV, and Creutzfeldt-Jakob disease. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 22, 248–254.
- Barja, G., 2014. The mitochondrial free radical theory of aging. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 127, 1–27.
- Blasko, I., Lederer, W., Oberbauer, H., Walch, T., Kemmler, G., Hinterhuber, H., Marksteiner, J., Humpel, C., 2006. Measurement of thirteen biological markers in CSF of patients with Alzheimer's disease and other dementias. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 21 (1), 9–15.
- Board, P.G., Menon, D., 2013. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3267–3288.
- Bradbury, M.W., 1997. Transport of iron in the blood-brain-cerebrospinal fluid system. *J. Neurochem.* 69, 443–454.
- Budni, J., Belletini-Santos, T., Mina, F., Garcez, M.L., Zugno, A.L., 2015. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging Dis.* 6 (5), 331–341.
- Carrillo, M.C., Kanai, S., Sato, Y., Kitani, K., 1992. Age-related changes in antioxidant enzyme activities are region and organ, as well as sex, selective in the rat. *Mech. Aging Dev.* 65, 187–198.
- Dexter, D.T., Carayon, A., Vidailhet, M., Ruberg, M., Agid, F., Agid, Y., Lees, A.J., Wells, F.R., Jenner, P., Marsden, C.D., 1990. Decreased ferritin levels in brain in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 55, 16–20.
- Escames, G., López, A., García, J.A., García, L., Acuña-Castroviejo, D., García, J.J., López, L.C., 2010. The role of mitochondria in brain aging and the effects of melatonin. *Curr. Neuropharmacol.* 8, 182–193.
- Estévez-González, A., Kulisevsky, J., Boltes, A., Otermer, P., García-Sánchez, C., 2003. Rey verbal learning test is a useful tool for differential diagnosis in the preclinical phase of Alzheimer's disease: comparison with mild cognitive impairment and normal aging. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 18, 1021–1028.
- Fearnley, J.M., Lees, A.J., 1991. Aging and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114, 2283–2301.
- Fjord-Larsen, L., Johansen, J.L., Kusk, P., Tornøe, J., Grønberg, M., Rosenblad, C., Wahlberg, L.U., 2005. Efficient in vivo protection of nigral dopaminergic neurons by lentiviral gene transfer of a modified neurturin construct. *Exp. Neurol.* 195, 49–60.
- Folstein, M.F., Folstein, S.E., McHugh, P.R., 1975. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.* 12 (3), 189–198.
- García-Moreno, J.M., Martín de Pablos, A., García-Sánchez, M.I., Méndez-Lucena, C., Damas-Hermoso, F., Rus, M., Chacón, J., Fernández, E., 2013. May serum levels of advanced oxidized protein products serve as a prognostic marker of disease duration in patients with idiopathic Parkinson's disease? *Antioxid. Redox Signal.* 18, 1296–1302.
- Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P., Fenn, W.O., 1964. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 119, 623–626.
- Godbout, J.P., Johnson, R.W., 2004. Interleukin-6 in the aging brain. *J. Neuroimmunol.* 147, 141–144.
- Harman, D.J., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.
- Hayes, J.D., Flanagan, I.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51–88.
- Hiramatsu, M., Kohno, M., Edamatsu, R., Mitsuta, K., Mori, A., 1992. Increased superoxide dismutase activity in aged human cerebrospinal fluid and rat brain determined by electron spin resonance spectrometry using the spin trap method. *J. Neurochem.* 58 (3), 1160–1164.
- Hirsch, E.C., Hunot, S., 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for

- neuroprotection? *Lancet Neurol.* 8, 382–397.
- Hirsch, E.C., Vyas, S., Hunot, S., 2012. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18, S210–212.
- Jefferson, A.L., Byerly, L.K., Vanderhill, S., Lambe, S., Wong, S., Ozonoff, A., Karlawish, J.H., 2008. Characterization of activities of daily living in individuals with mild cognitive impairment. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 16, 375–383.
- Jenner, P., 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 53, S26–36.
- Ji, L.L., 2001. Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 928, 236–247.
- Joseph, P.D., 2010. Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. *Hum. Genomics Proteomics* 876940. <http://dx.doi.org/10.4061/2010/876940>.
- Kimpara, T., Takeda, A., Yamaguchi, T., Arai, H., Okita, N., Takase, S., Sasaki, H., Itoyama, Y., 2000. Increased bilirubins and their derivatives in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 21 (4), 551–554.
- Korhonen, L., Riikonen, R., Nawa, H., Lindholm, D., 1998. Brain derived neurotrophic factor is increased in cerebrospinal fluid of children suffering from asphyxia. *Neurosci. Lett.* 240, 151–154.
- Kriegstein, K., Henheik, P., Farkas, L., Jaszai, J., Galter, D., Krohn, K., Unsicker, K., 1998. Glia cell line-derived neurotrophic factor requires transforming growth factor-beta for exerting its full neurotrophic potential on peripheral and CNS neurons. *J. Neurosci.* 18, 9822–9834.
- Kroksveen, A.C., Opsahl, J.A., Aye, T.T., Ulvik, R.J., Berven, F.S., 2011. Proteomics of human cerebrospinal fluid: discovery and verification of biomarker candidates in neurodegenerative diseases using quantitative proteomics. *J. Proteome* 74, 371–388.
- Kuiper, M.A., Mulder, C., van Kamp, G.J., Scheltens, P., Wolters, E.C., 1994. Cerebrospinal fluid ferritin levels of patients with Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and multiple system atrophy. *J. Neural Transm. Park. Dis. Dement. Sect. 7*, 109–114.
- Lai, S.W., Chen, J.H., Lin, H.Y., Liu, Y.S., Tsai, C.F., Chang, P.C., Lu, D.Y., Lin, C., 2018. Regulatory effects of neuroinflammatory responses through brain-derived neurotrophic factor signaling in microglial cells. *Mol. Neurobiol.* <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-018-0933-z>.
- Lawton, M.P., Brody, E.M., 1969. Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist* 9, 179–186.
- Lin, L.F., Doherty, D.H., Lile, J.D., Bektesh, S., Collins, F., 1993. GDNF, a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260, 1130–1132.
- Lobo, A., Ezquerro, J., Gómez-Burgada, F., Sala, J.M., Seva-Díaz, A., 1979. Cognitive mini-test (a simple practical test to detect intellectual changes in medical patients). *Actas Luso Esp. Neurol. Psiquiatr. Cienc. Afines* 7 (3), 189–202.
- Lovell, M.A., Xie, C., Markesbery, W.R., 1998. Decreased glutathione transferase activity in brain and ventricular fluid in Alzheimer's disease. *Neurology* 51 (6), 1562–1566.
- Manubens, J.M., Martínez-Lage, P., Martínez-Lage, J.M., Larumbe, R., Muruzábal, J., Martínez-González, M.A., Guarch, C., Urrutia, T., Sarraqueta, P., Lacruz, F., 1998. Variación de las puntuaciones del Mini-Mental con la edad y el nivel educativo. Datos normalizados en la población mayor de 70 años de Pamplona. *Neurología* 13 (3), 111–119.
- Markesbery, W.R., Carney, J.M., 1999. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 9 (1), 133–146.
- Martín de Pablos, A., García-Moreno, J.M., Fernández, E., 2015. Does the cerebrospinal fluid reflect altered redox state but not neurotrophic support loss in Parkinson's disease? *Antioxid. Redox Signal.* 23 (11), 893–898.
- Martin, M., Macias, M., Escames, G., León, J., Acuña-Castroviejo, D., 2000. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J.* 14, 1677–1697.
- Mazzetti, A.P., Fiorile, M.C., Primavera, A., LoBello, M., 2015. Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. *Neurochem. Int.* 82, 10–18.
- Miles, M.V., Morrison, J.A., Horn, P.S., Tang, P.H., Pesce, A.J., 2004. Coenzyme Q10 changes are associated with metabolic syndrome. *Clin. Chim. Acta* 344 (1–2), 173–179.
- Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., Ichinose, H., Nagatsu, T., 1999. Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 270 (1), 45–48.
- Montejo-Carrasco, P., Montenegro-Peña, M., Sueiro, M.J., 2012. The Memory Failures of Everyday (MFE) test: normative data in adults. *Span. J. Psychol.* 15 (3), 1424–1431.
- Navarro-Yepes, J., Burns, M., Anandhan, A., Khalimonchuk, O., del Razo, L.M., Quintanilla-Vega, B., Pappa, A., Panayiotidis, M.I., Franco, R., 2014. Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 66–85.
- Nelson, K.J., Parsonage, D., 2011. Measurement of peroxiredoxin activity. *Curr. Protoc. Toxicol.* 7 (Unit 7.10).
- Okabe, T., Hamaguchi, K., Inafuku, T., Hara, M., 1996. Aging and superoxide dismutase activity in cerebrospinal fluid. *J. Neurol. Sci.* 141, 100–104.
- Olazarán, J., Mouronte, P., Bermejo, F., 2005. Validez clínica de dos escalas de actividades instrumentales en la enfermedad de Alzheimer. *Neurología* 20 (8), 395–401.
- Perneczky, R., Pohl, C., Sorg, C., Hartmann, J., Komossa, K., Alexopoulos, P., Wagenpfeil, S., Kurz, A., 2006. Complex activities of daily living in mild cognitive impairment: conceptual and diagnostic issues. *Age Ageing* 35, 240–245.
- Pertusa, M., García-Matas, S., Rodríguez-Farré, E., Sanfeliu, C., Cristófol, R., 2007. Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *J. Neurochem.* 101, 794–805.
- Pfeffer, R.L., Kurosaki, T.T., Harrah Jr., C.H., Chance, J.M., Filos, S., 1982. Measurement of functional activities in older adults in the community. *J. Gerontol.* 37 (3), 323–329.
- Phillipson, O.T., 2014. Management of the aging risk factor for Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 35, 847–857.
- Rinaldi, P., Polidori, M.C., Metastasio, A., Mariani, E., Mattioli, P., Cherubini, A., Catani, M., Cecchetti, R., Senin, U., Mecocci, P., 2003. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 24 (7), 915–919.
- Ritzel, R.M., Patel, A.R., Pan, S., Craspe, J., Hammond, M., Jellison, E., McCullough, L.D., 2015. Age- and location-related changes in microglial function. *Neurobiol. Aging* (15) (00116-5, pii: S0197-4580).
- Rodrigues Siqueira, I., Fochesatto, C., da Silva Torres, I.L., Dalmaz, C., Alexandre Netto, C., 2005. Aging affects oxidative state in hippocampus, hypothalamus and adrenal glands of Wistar rats. *Life Sci.* 78 (3), 271–278.
- Rosenblad, C., Kirik, D., Devaux, B., Moffat, B., Phillips, H.S., Björklund, A., 1999. Protection and regeneration of nigral dopaminergic neurons by neurturin or GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease after administration into the striatum or the lateral ventricle. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1554–1566.
- Ryan, J.J., Geisser, M.E., 1986. Validity and diagnostic accuracy of an alternate form of the Rey Auditory Verbal Learning Test. *Arch. Clin. Neuropsychol.* 1 (3), 209–217.
- Scherman, D., Desnos, C., Darchen, F., Pollak, P., Javoy-Agid, F., Agid, Y., 1989. Striatal dopamine deficiency in Parkinson's disease: role of aging. *Ann. Neurol.* 26, 551–557.
- Silhol, M., Arancibia, S., Perrin, D., Maurice, T., Alliot, J., Tapia-Arancibia, L., 2008. Effect of aging on brain-derived neurotrophic factor, proBDNF, and their receptors in the hippocampus of Lou/C rats. *Rejuvenation Res.* 11, 1031–1040.
- Singhal, S.S., Singh, S.P., Singhal, P., Horne, D., Singhal, J., Awasthi, S., 2015. Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 289, 361–370.
- Spindler, M., Beal, M.F., Henchcliffe, C., 2009. Coenzyme Q10 effects in neurodegenerative disease. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 5, 597–610.
- Straten, G., Eschweiler, G.W., Maetzler, W., Laske, C., Leyhe, T., 2009. Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) concentrations in cerebrospinal fluid and serum of patients with early Alzheimer's disease and normal controls. *J. Alzheimers Dis.* 18 (2), 331–337.
- Torres, L.L., Quaglio, N.B., de Souza, G.T., Garcia, R.T., Dati, L.M., Moreira, W.L., Loureiro, A.P., de Souza-Talarico, J.N., Smid, J., Porto, C.S., Bottino, C.M., Nitri, R., Barros, S.B., Camarini, R., Marcourakis, T., 2011. Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 26 (1), 59–68.
- Unsicker, K., Flanders, K.C., Cissel, D.S., Lafyatis, R., Sporn, M.B., 1991. Transforming growth factor beta isoforms in the adult rat central and peripheral nervous system. *Neuroscience* 44, 613–625.
- Wyss-Coray, T., Lin, C., Yan, F., Yu, G.Q., Rohde, M., McConlogue, L., Masliah, E., Mucke, L., 2001. TGFβ1 promotes microglial amyloid-β clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nat. Med.* 7, 612–618.
- Zetterberg, H., Andreasen, N., Blennow, K., 2004. Increased cerebrospinal fluid levels of transforming growth factor-beta1 in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 367 (2), 194–196.
- Zhang, X., Zeng, L., Yu, T., Xu, Y., Pu, S., Du, D., Jiang, W., 2014. Positive feedback loop of autocrine BDNF from microglia causes prolonged microglia activation. *Cell Physiol. Biochem.* 34 (3), 715–723.

NEWS & VIEWS

Does the Cerebrospinal Fluid Reflect Altered Redox State But Not Neurotrophic Support Loss in Parkinson's Disease?

Angel Martín de Pablos,^{1,2} José-Manuel García-Moreno,^{1,3} and Emilio Fernández¹

Abstract

Alteration in neurotrophic factors support and antioxidant defenses in the central nervous system (CNS) along with deficit of ferritin have been associated with idiopathic Parkinson's disease (PD). The objectives were to analyze in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with PD and controls the following: (i) the levels of the neuroprotectant factors glial cell line-derived neurotrophic factor, persephin, neurturin, and brain-derived neurotrophic factor, (ii) the levels of transforming growth factor- β_1 (TGF β_1) and transforming growth factor- β_2 (TGF β_2), proinflammatory factors, (iii) the activity of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST), catalase, superoxide dismutases (SODs), and peroxiredoxins (PRDxs), and (iv) ferritin levels. The study revealed that, among neurotrophic factors, only TGF β_1 levels were found to be enhanced in patients with PD (early, $p < 0.05$; advanced, $p < 0.02$). Regarding antioxidant enzymes, the activity of GPx, catalase, and PRDxs, all hydrogen peroxide scavengers, was found to be significantly reduced in patients (GPx, $p < 0.001$; catalase, $p < 0.01$; PRDxs, $p < 0.01$, one-way analysis of variance). Finally, ferritin content in CSF was significantly diminished over time in patients (early, $p < 0.01$, -49%; advanced, $p < 0.001$, -80.7%). Our observations lead to the hypothesis that parkinsonian patients suffer from a serious disturbance of redox state in the CNS, as evaluated through the CSF, characterized by reduced hydrogen peroxide scavenging and iron storage. *Antioxid. Redox Signal.* 00, 000–000.

Introduction

ALTHOUGH THE CAUSE of idiopathic Parkinson's disease (PD) is unknown, several hypotheses have been put forward. Alteration in neurotrophic factors support of dopamine neurons of substantia nigra and deficit of antioxidant defenses in the central nervous system (CNS) along with deficit of ferritin have been associated with PD.

Regarding neurotrophic support, neurotrophic factors such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and ligands belonging to the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) family are considered to facilitate the survival of dopaminergic cells, neurons that die in the course of PD (1, 2). In contrast, members of the transforming growth factor (TGF) family such as TGF β_1 and TGF β_2 are potent regulators

of inflammatory responses in the CNS (6) and they seem to be produced in astrocytes and microglial cells as part of the neuroinflammatory response of the disease. Changes in all of these ligands in the cerebrospinal fluid (CSF), a fluid in close contact with nerve tissue and considered as a good witness of neurodegeneration, deserve to be further analyzed.

Oxidative stress, defined as a disbalance between the production of reactive oxidative species and antioxidant mechanisms, has been postulated to underlie parkinsonian neurodegeneration (7). Oxidative stress can be detected in blood, brain tissue, and CSF of PD patients. CSF antioxidant defenses are known to be seriously affected because the activity of important enzymes such as glutathione-S-transferase (GST), the ferroxidase ceruloplasmin, and the peroxidase DJ-1 or PARK7 is reduced (8). However, either conflicting results

¹Laboratory of Neurophysiology and Molecular Neurology (BIO127), Department of Medical Physiology and Biophysics, University of Seville, Seville, Spain.

²Department of Surgery, University of Seville and Department of Anesthesiology, Hospital Macarena, Seville, Spain.

³Neuroscience Clinical Unit & Asociación Neuroinvest, Hospital Macarena, Seville, Spain.

Innovation

Alterations in neurotrophic factors support and antioxidant defenses along with deficit of ferritin have been associated with idiopathic Parkinson's disease. After analyzing the cerebrospinal fluid, less neurotrophic support was not observed as far as glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands and brain-derived neurotrophic factor levels are concerned. Only the proinflammatory ligand transforming growth factor- β_1 (TGF β_1) was enhanced. We also note that the enzymatic activity of hydrogen peroxide scavengers, but not superoxide anion scavengers, is reduced, and ferritin content is reliably diminished. Our observations indicate that parkinsonian patients suffer from a serious disturbance of redox state in the central nervous system, with altered hydrogen peroxide scavenging and iron storage.

or no changes have been reported as to other CSF antioxidant enzymes such as superoxide dismutases (SODs), superoxide anion scavengers, or the hydrogen peroxide (H₂O₂) scavengers, glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), and catalase (8).

In addition, it has been proposed that cell death in the substantia nigra in PD patients is associated with increased iron content together with decreased levels of ferritin, iron storage protein (4). Ferritin is known to bind about one third of iron in the brain, and low ferritin levels would enhance free iron. Changes of ferritin in CSF in PD patients are not well known. The objectives of this study were to analyze in the CSF of PD patients and controls the following: (i) the levels of the neuroprotectant factors GDNF, persephin, neurturin, and BDNF, (ii) the levels of TGF β_1 and TGF β_2 , proinflammatory TGF family ligands, (iii) the activity of the antioxidant enzymes GPx, GR, GST, catalase, SODs, and peroxiredoxins (PRDxs), and (iv) ferritin levels. Clinical situation was evaluated through the Hoehn and Yahr scale, Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS), and years of disease.

Results and Discussion

First, we verified whether the main clinical characteristics were similar between the PD and control groups. All parameters were similar except for hypertension ($p < 0.01$), more frequent in patients with PD relative to controls, as shown in Table 1.

Second, we quantified levels of GDNF family ligands (GDNF, persephin, and neurturin) and BDNF, all of them considered as neuroprotectant trophic factors, through the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Levels of GDNF, persephin, and BDNF in CSF were not found to be different among groups, and neurturin was undetectable likely because its level is below the detection range of the ELISA kit, as shown in Table 2. Then, levels of the TGF family ligands, TGF β_1 and TGF β_2 , considered as neuroinflammatory factors, were also measured through ELISA. One-way analysis of variance (ANOVA) indicated a significant group effect on TGF β_1 values ($F_{2,36} = 4.7$, $p < 0.02$). TGF β_1 values in CSF were significantly enhanced in both early and advanced PD patients relative to controls (early PD, $p < 0.05$; advanced PD, $p < 0.01$, Newman-Keuls), as shown

TABLE 1. CLINICAL PARAMETERS OF PATIENTS AND CONTROLS

	PD (n = 29)	Control (n = 21)	p
Clinical parameters			
Age (years)	63.4 \pm 0.9	67.9 \pm 10	NS
Sex, male n (%)	14 (48)	13 (62)	NS
Body mass index	24.1 \pm 4	24.5 \pm 3	NS
Hypertension n (%)	12 (40)	4 (19)	<0.01
Dyslipidemia n (%)	6 (21)	4 (19)	NS
Vitamin A/E supplement	6 (21)	5 (24)	NS
Statin use n (%)	4 (14)	2 (9.5)	NS
Aspirin n (%)	5 (16)	3 (14.2)	NS

Mean \pm SEM. Statistical comparisons were carried out with the χ^2 test (qualitative variables) or the Student's *t*-test (quantitative variables).

PD, Parkinson's disease; SEM, standard error of the mean.

in Table 2. CSF changes in patients were found to be enhanced over time, because TGF β_1 values in early PD patients were significantly lower than those observed in advanced PD patients ($p < 0.05$). Following statistical correlations between TGF β_1 levels and clinical parameters, a positive correlation was found between TGF β_1 and motor UPDRS III ($r = 0.55$, $p < 0.001$, Pearson's test), as shown in Figure 1. No significant differences between patients and control subjects were observed on TGF β_2 values.

Third, to further evaluate the role of CSF antioxidant enzymes in PD patients, the activity of GPx, GR, GST, catalase, SODs, and PRDxs was measured through ELISA or the horseradish peroxidase (HRP) method (9). GPx activity was found to be significantly reduced in PD patients, as indicated by the one-way ANOVA (group effect, $F_{2,36} = 44.1$, $p < 0.001$). PD patients showed lower GPx levels relative to controls (early PD, $t = 6.8$, $p < 0.001$; advanced PD, $t = 6.8$, $p < 0.001$), as shown in Figure 2. Percentage mean GPx activity was found to be strongly reduced in both groups of PD patients (early PD, -84.6% ; advanced PD, -85.5%). Catalase activity was also found to be significantly reduced in PD patients (one-way ANOVA, $F_{2,36} = 4.7$, $p < 0.015$). PD patients showed lower

TABLE 2. LEVELS (PG/ML) OF GDNF, PERSEPHIN, NEURTURIN, TGF β_1 , TGF β_2 , AND BDNF IN THE CEROBROSPINAL FLUID OF PARKINSONIAN PATIENTS AND CONTROLS

	Early PD	Advanced PD	Controls
GDNF	91.2 \pm 10.2	103.1 \pm 9.9	104.1 \pm 13
Persephin	106.8 \pm 8.1	123.2 \pm 8.9	113.4 \pm 6.2
Neurturin	nd	nd	nd
TGF β_1	54.2 \pm 4 ^{a,b}	63.9 \pm 3.7 ^c	39.7 \pm 7
TGF β_2	182.8 \pm 33	176.6 \pm 34	177.2 \pm 25
BDNF	231.4 \pm 27.7	235.5 \pm 25.5	299.2 \pm 30

Mean \pm SEM.

^a $p < 0.01$ versus controls.

^b $p < 0.05$ versus advanced patients.

^c $p < 0.001$ versus controls.

BDNF, brain-derived neurotrophic factor; GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor; nd, not detectable; TGF β_1 , transforming growth factor- β_1 ; TGF β_2 , transforming growth factor- β_2 .

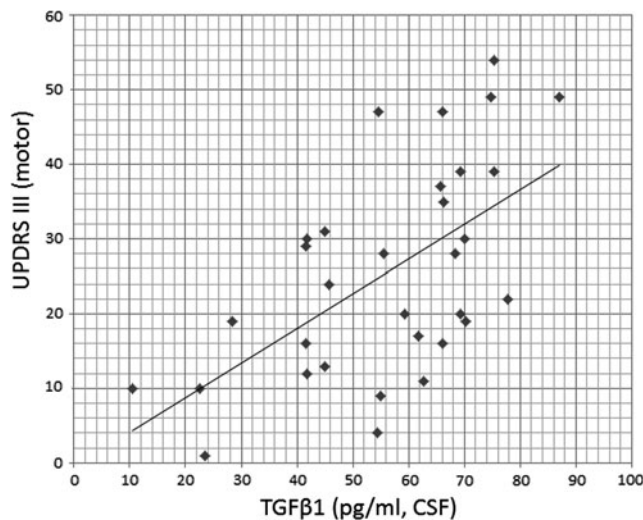


FIG. 1. Correlation between TGF β_1 levels (pg/ml) and UPDRS III in CSF. A significant and positive Pearson's correlation was found between TGF β_1 and UPDRS III ($r=0.55$, $p<0.001$, Pearson's test). UPDRS III is the motor scale of UPDRS. CSF, cerebrospinal fluid; TGF β_1 , transforming growth factor- β_1 ; UPDRS, Unified Parkinson's Disease Rating Scale.

activity levels than controls (early PD, $t=2.1$, $p<0.05$; advanced PD, $t=2.8$, $p<0.017$). Mean catalase activity was reduced by 59.4% and 78.2% in early and advanced PD patients, respectively. Finally, activity of PRDxs was also found to be significantly reduced in PD patients (one-way ANOVA, group

effect, $F_{2,36}=4.9$, $p<0.01$). Activity of PRDxs was found to be reduced in both groups of PD patients relative to controls (early PD, $t=2.2$, $p<0.05$; advanced PD, $t=2.7$, $p<0.01$). Mean PRDxs activity was reduced by 60% and 68% in early and advanced PD patients, respectively. No changes were observed in the activity of the remainder enzymes, GR, GST, and SODs, as observed in Figure 2. No correlations with clinical parameters were observed.

Four, to further study the metabolism of iron storage in PD patients, ferritin content was quantified in CSF of patients and controls through ELISA. Ferritin level in CSF was significantly altered in patients (one-way ANOVA, group effect, $F_{2,36}=14.3$, $p<0.001$). Thus, CSF ferritin was significantly reduced in early ($t=2.7$, $p<0.013$) and advanced PD patients ($t=5.9$, $p<0.001$) relative to controls. Percentage levels were reduced by 49% and 80.7% in early and advanced PD patients, respectively (Fig. 3), indicating that changes worsened over time. No correlations with clinical parameters were observed, except for the Hoehn-Yahr stage ($r=-0.51$, $p<0.05$; Pearson's test).

Finally, the Tibbling-Link index was quantified to confirm that CSF protein levels were not influenced by blood levels due to blood-brain barrier inflammation. The Tibbling-Link index in the PD group was lower than 0.7 in every case, and it was observed not to be different relative to the control group (0.45 ± 0.01 PD; 0.42 ± 0.01 controls). Hence, no inflammation of the blood-brain barrier was detected in PD patients, in accordance with previous data (5).

Idiopathic PD has been associated with altered neurotrophic support. Our study reveals that at least the neuroprotectant

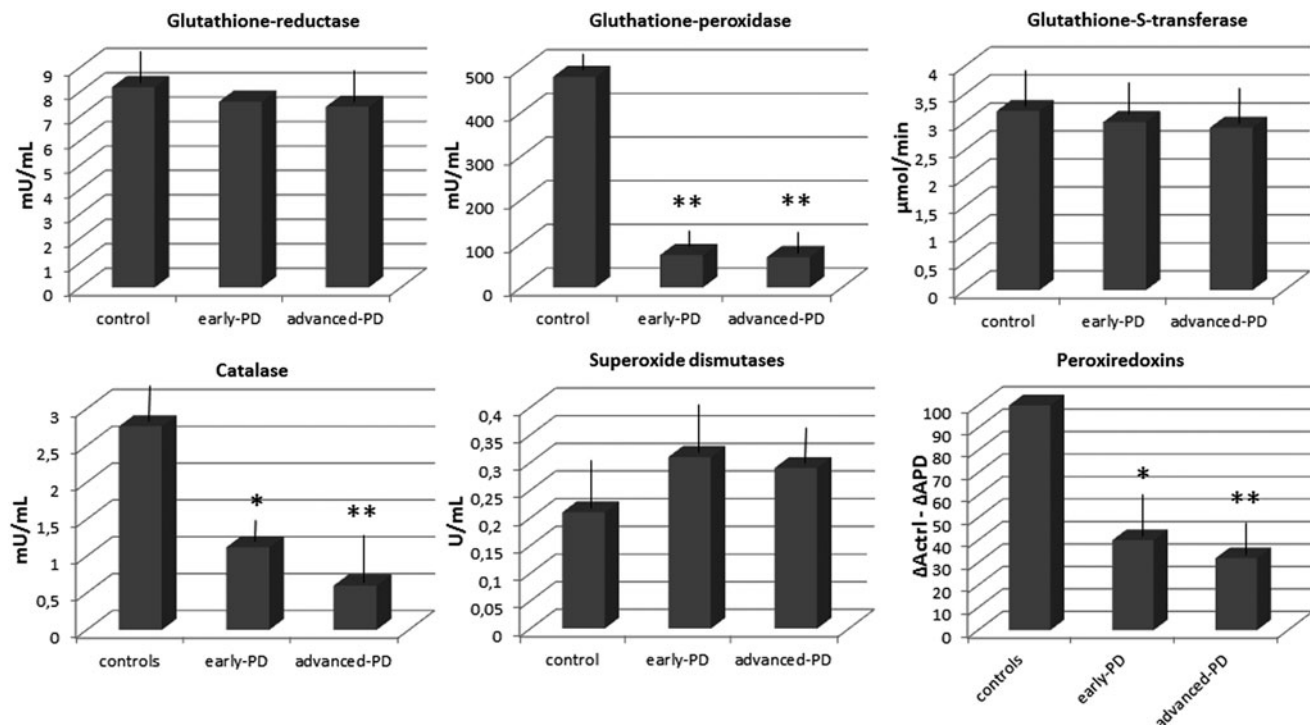


FIG. 2. Activity levels in the CSF of the antioxidant enzymes GR, GPx, GST, catalase, SODs, and PRDxs in early and advanced PD patients and control subjects. Comparisons were carried out with one-way ANOVA followed by *post hoc* Student's *t*-test. Mean \pm SEM, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ versus controls. ANOVA, analysis of variance; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GST, glutathione-S-transferase; PD, Parkinson's disease; PRDxs, peroxiredoxins; SEM, standard error of the mean; SOD, superoxide dismutase.

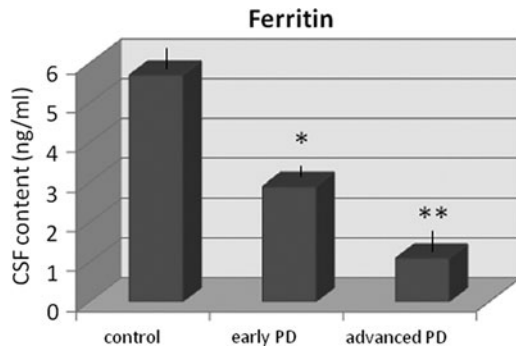


FIG. 3. CSF content of ferritin, iron storage protein, in early and advanced PD patients and control subjects. Comparisons were carried out with one-way ANOVA followed by *post hoc* Student's *t*-test. Mean \pm SEM, * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ versus controls.

mediators GDNF, persephin, and BDNF are not altered in CSF of parkinsonian patients. Hence, it can be concluded that neurotrophic factors support is not altered in PD patients as far as the GDNF family ligands and BDNF are concerned. Regarding GDNF, the most studied GDNF family ligand, several authors have already pointed out that this factor is not modified in PD patients because the content of GDNF in nigrostriatal regions or the expression of its receptors cRet and GRF α 1 is not found to be altered in patients (3). In this context, GDNF, persephin, and BDNF are known to exert neuroprotective effects in animal models of PD, a fact that has prompted numerous suggestions that these neurotrophic factors may be

therapeutic tools to treat PD (2). In contrast, among all neurotrophic factors which were analyzed in this study, only TGF β ₁ was found to be elevated in CSF of patients. Since TGF β ₁ is considered as a neuroinflammatory factor, it can be hypothesized that changes of TGF β ₁ in CSF could be accounted for by an ongoing neuroinflammatory process (6). Of note is that statistical correlations of this proinflammatory mediator point to an important role for neuroinflammation in the clinical evolution of PD because TGF β ₁ levels in CSF are enhanced in parallel with motor deficits, as evaluated through UPDRS III.

Idiopathic PD has also been associated with oxidative stress (7). After analyzing the enzymatic activity of superoxide anion and H₂O₂ scavengers, the data reveal a disturbance of H₂O₂ scavenging, but not superoxide anion scavenging, as manifested through a reliably reduced activity of GPx, catalase, and PRDxs, without changes in SODs (Fig. 4). GPxs are selenoproteins that reduce peroxides in water. They also reduce lipid hydroperoxides to their corresponding alcohols. Catalases are ubiquitous enzymes that mediate the decomposition of H₂O₂ in water. PRDxs are cysteine-dependent peroxidases that react with hydrogen peroxide and hydroperoxide substrates. Data fit well with the presence of peroxidation stress due to reduced antioxidant defenses related to hydrogen peroxide scavenging, and it can be hypothesized that neurons would be less protected from oxidative damage in patients with PD.

Finally, our data indicate that ferritin content is reliably and progressively reduced in CSF of PD patients, a novel result to our knowledge because ferritin was found to be reduced in the brain tissue of PD patients rather than in CSF

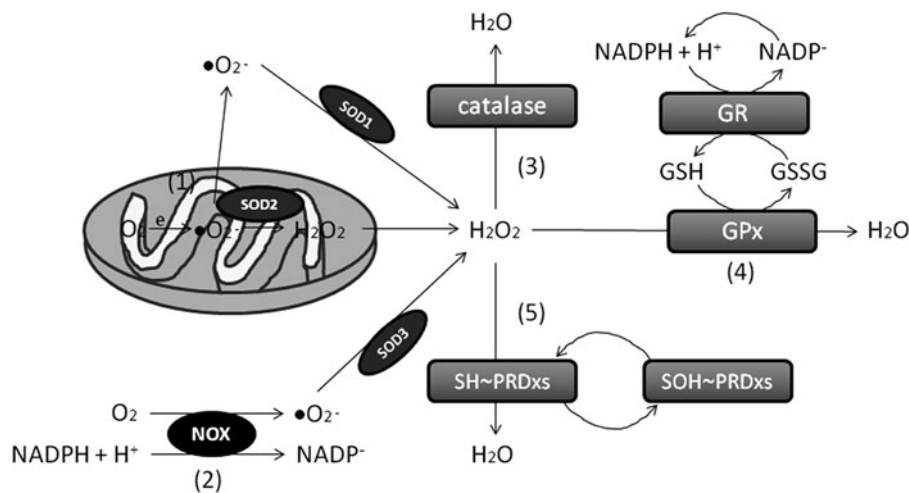


FIG. 4. Pathways of normal redox homeostasis leading to the final formation of water, through the scavenging of superoxide anion and hydrogen peroxide. The main production of superoxide anion is in the mitochondrial matrix (1) or through the NOX enzymes (2), mostly located extracellularly and attached to the plasmatic membrane. Superoxide anions are catalyzed into hydrogen peroxide through several SODs: SOD1 or copper–zinc SOD of the cytosol, SOD2 or manganese SOD of the mitochondria, and SOD3 or extracellular SOD. Hydrogen peroxide is then converted into water through catalases (3), GPx (4), and PRDxs (5). GPx is integrated in the GSH system, where NADPH acts as the electron donor through GR. GSH is transformed in GSSG detoxifying the cells. PRDxs are thiol (SH–) peroxidases. Hydrogen peroxide oxidizes the cysteine of PRDxs to protein sulfenic acid (SOH–). In this study, low activity of GPx, catalase, and PRDxs in the CSF of PD patients has been detected. It seems that these altered reactions would lead to peroxidation stress with accumulation of hydrogen peroxide, which would be transformed into reactive oxidative species through alternative redox reactions such as the Fenton reaction (7). GSH, glutathione; GSSG, glutathione disulfide; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NOX, NADPH oxidase.

(4). Ferritin is known to bind about one third of iron in the brain, and low ferritin levels would then enhance free iron. In this context, it has been proposed that cell death in the substantia nigra in PD patients is associated with increased iron content together with decreased levels of ferritin (4). Taken together, the enzymatic and ferritin data indicate a serious alteration of redox homeostasis in patients' CSF, characterized by deficit of hydrogen peroxide scavenging and iron storage.

To sum up, the findings indicate that CSF analysis of patients with PD does not reveal a deficit of neurotrophic factors support as far as the neuroprotectant GDNF family ligands and BDNF are concerned. Among the studied neurotrophic factors, only the proinflammatory $TGF\beta_1$ is observed to be augmented in patients. Regarding antioxidant defenses, the reliable decrease in the activity of GPx, catalase, and PRDxs without changes in SODs indicates altered hydrogen peroxide scavenging, likely reflecting the presence of peroxidation stress. The content of ferritin, iron storage protein, in CSF is also found to be reliably diminished. The enzymatic and ferritin data indicate a serious disturbance of redox homeostasis in patients with PD, characterized by deficit of hydrogen peroxide scavenging and iron storage.

Notes

Study participants

Patients suffering from PD and diagnosed by a neurologist based on single-photon emission computed tomography (SPECT) and clinical information were included in this study. Patients were classified and scored according to the Hoehn–Yahr stages and UPDRS. Following Hoehn–Yahr criteria, patients were divided into the early PD group (Hoehn–Yahr stages 1 and 2) and advanced PD group (Hoehn–Yahr stages 3 and 4). UPDRS comprised total UPDRS, motor symptoms or UPDRS III, and disease complications or UPDRS IV. All subjects were nonsmokers or nonalcohol drinkers (smoking and alcohol drinking modify biochemical CSF parameters) (5). Smoking was defined as current smoker who consumed cigarettes on a daily basis or occasional smokers. Alcohol use was defined as drinking >210 g per week. Control subjects were recruited from either patients' relatives or volunteers subjected to intradural anesthesia for surgery in the Service of Surgery of Hospital Macarena and without any neurological disorder. Individuals presenting with any of liver, renal, and cardiac dysfunctions, malabsorption, autoimmune diseases, diabetes mellitus, rheumatoid arthritis, AIDS, and infectious conditions (because oxidative stress markers in peripheral fluids may be altered in such conditions), were excluded from both PD and control groups. Diabetes mellitus and rheumatoid arthritis were defined based on WHO criteria.

The following clinical information was gathered from each patient: age, sex, body weight, hypertension, dyslipidemia, coffee drinking, smoking, taking of vitamin A/vitamin E supplement, statins and aspirins, daily levodopa dose, type and dose of dopamine agonists, and rasagiline. Hypertension was diagnosed when blood pressure repeatedly exceeded 140 mmHg (systolic) and/or 90 mmHg (diastolic) or when a subject was taking antihypertensive medication to control hypertension. Use of vitamin A/E was defined as daily intake of either vitamin A or vitamin E. Drinking coffee was defined as daily intake of at least 300 ml of coffee.

CSF collection

CSF was collected using lumbar puncture. Five milliliters of CSF was collected and stored in polypropylene tubes (Eurotube), protected by light, and rapidly aliquoted, coded, and frozen at -80°C for further studies. One-milliliter collection in a glass tube was employed to observe the absence of traumatic puncture and to quantify red cells before storing. CSF with excess of red cells was discarded (>500 red cells/ μL).

Tibbling-Link index

CSF was collected in polypropylene tubes. Simultaneously, blood samples were obtained (5). CSF samples were centrifugated at 450 g for 10 min and the supernatant was recovered. Then, paired CSF and serum were aliquoted and stored under biobanking conditions until studies were performed. Albumin and IgG were quantified by standard immunochemical nephelometry in serum and CSF samples (Siemens BN II system). IgG indexes were calculated as previously described (5). It has been defined that IgG oligoclonal bands are not detected in patients with IgG indexes smaller than 0.45; however, indexes higher than 0.77 reflect intrathecal IgG synthesis.

ELISA measurement

CSF aliquots were unfrozen and sonicated with homogenizing solution (150 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.6 μM leupeptin, and 1% Triton X-100, pH 7.4). For measuring levels of GDNF, persephin, neurturin, BDNF, $TGF\beta_1$, and $TGF\beta_2$ in CSF, commercial kits were used (GDNF E_{max} ImmunoAssay System, Promega; Human Persephin ELISA Kit, Wuhan EIAab Science Co. Ltd.; Human Neurturin ELISA Kit, Wuhan EIAab Science Co. Ltd.; Human BDNF ELISA kit, Boster Biological Tech; $TGF\beta_1$ E_{max} Immunoassay System, Promega; $TGF\beta_2$ Human ELISA kit, Abcam) following manufacturer's instructions.

Commercially available ELISA kits were used for evaluating the activity of the antioxidant enzymes GR, GPx, GST, catalase, and SOD. ELISA kits were purchased from Bioxytech (GR-340 assay kit; Oxis International, Inc.) and Biovision (GPx activity kit 762-100, GST Assay Kit K263-100, Catalase activity Assay Kit, SOD activity Kit K335-100). The GR-340 assay is based on the oxidation of NADPH to NADP^+ catalyzed by a limiting concentration of GR. One GR activity unit is defined as the amount of enzyme catalyzing the reduction of 1 μmol of GSSG per minute at pH 7.5 and 25°C . Biovision glutathione peroxidase assay kit measures GPx activity through a coupled reaction with GR. The GST colorimetric activity assay kit is based on the GST-catalyzed reaction between GSH and CDBN, GST substrate. As for catalase, this enzyme reacts with hydrogen peroxide to produce water and oxygen, and the unconverted hydrogen peroxide reacts with the probe to produce a product that can be measured at 570 nm. The inhibition activity of SOD of the rate of the reduction with a superoxide anion is measured by the SOD activity assay kit. Finally, peroxiredoxin activity was measured following the HRP method, based on measurement of peroxide-dependent PRDx activity with hydrogen peroxide using the HRP competition assay (9).

Statistics and ethics

We obtained CSF from 29 patients, comprising four Hoehn–Yahr stages (stage 1, $n=12$; stage 2, $n=12$; stage 3, $n=8$; stage 4, $n=5$), and 21 controls. Stage 1 and 2 patients were considered as the early PD group ($n=24$) and stages 3 and 4 patients were considered as the advanced PD group ($n=13$). One-way ANOVA was used for statistical comparisons ($n=13/\text{group}$), followed by *post hoc* Newman–Keuls' test or Student's *t*-test. Correlations were performed with the Pearson's test or the single linear regression test. Two group comparisons were carried out with the Student's *t*-test. If needed, normalization was verified with the Shapiro–Wilk test. Informed consent forms under a protocol approved by the University of Seville and Macarena Hospital internal ethics and scientific boards were obtained from all the subjects, and the subjects' consent was obtained according to the Declaration of Helsinki (BMJ 1991; 302: 1194).

Acknowledgments

The authors thank Mara Guerra and Silvia Castellano (BIO127 lab, University of Seville) for their excellent technical assistance; Dr. Luis Capitán for his continuous support (Vicedean, School of Medicine of Seville); Dr. Guillermo Izquierdo and Dr. Castiñeiras for allowing the use of the facilities of the Services of Neurology and Surgery, respectively (Hospital Macarena, Seville); Dr. Maria-Isabel Garcia-Sánchez and the Biobanco Hospitalario Macarena (National Biobank Network, Carlos III Health Institute RD09/0076/00080) for their support in the samples collection procedure and storage and Tibbling-Link measures; and Dr. Cinta Calvo and the Service of Nuclear Medicine (Hospital Macarena, Seville) for SPECT analyses. The authors are most grateful to all patients and their partners as well as control subjects who participated in this study. This study was supported by grants to EF by Junta de Andalucía (BIO127).

References

- Airaksinen MS and Saarna M. The GDNF family: signaling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 3: 383–394, 2002.
- Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, and Patel NK. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther* 138: 155–175, 2013.
- Bäckman CM, Shan L, Zhang YJ, Hoffer BJ, Leonard S, Troncoso JC, Vonsattel P, and Tomac AC. Gene expression patterns for GDNF and its receptors in human putamen affected by Parkinson's disease: a real-time PCR study. *Mol Cell Endocrinol* 252: 160–166, 2006.
- Dexter DT, Carayon A, Vidailhet M, Ruberg M, Agid F, Agid Y, Lees AJ, Wells FR, Jenner P, and Marsden CD. Decreased ferritin levels in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem* 55: 16–20, 1990.
- Fernández E, García-Moreno JM, Martín de Pablos A, and Chacón J. May the evaluation of nitrosative stress through selective increase of 3-nitrotyrosine proteins other than nitroalbumin and dominant tyrosine-125/136 nitrosylation of serum α -synuclein serve for diagnosis of sporadic Parkinson's disease? *Antioxid Redox Signal* 19: 912–918, 2013.
- Hirsch EC and Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 8: 382–397, 2009.
- Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53 Suppl 3: S26–S36, 2003.
- Maarouf CL, Beach TG, Adler CH, Shill HA, Sabbagh MN, Wu T, Walker DG, Kokjohn TA, Roher AE; Arizona PD Consortium. Cerebrospinal fluid biomarkers of neuropathologically diagnosed Parkinson's disease subjects. *Neurol Res* 34: 669–676, 2012.
- Nelson KJ and Parsonage D. Measurement of peroxiredoxin activity. *Curr Protoc Toxicol* 7: Unit7.10, 2011.

Address correspondence to:

Dr. Emilio Fernández

Laboratorio de Neurofisiología

y Neurología Molecular (BIO127)

Departamento de Fisiología Médica y Biofísica

Universidad de Sevilla

Avenida Sanchez Pizjuan 4

Sevilla E-41009

Spain

E-mail: efespejo@us.es

Date of first submission to ARS Central, August 3, 2015; date of acceptance, August 10, 2015.

Abbreviations Used

ANOVA = analysis of variance
 BDNF = brain-derived neurotrophic factor
 CDBN = chloro-2,4-dinitrobenzene
 CNS = central nervous system
 CSF = cerebrospinal fluid
 ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay
 GDNF = glial cell line-derived neurotrophic factor
 GPx = glutathione peroxidase
 GR = glutathione reductase
 GSH = glutathione
 GSSG = glutathione disulfide
 GST = glutathione-S-transferase
 H₂O₂ = hydrogen peroxide
 HEPES = 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
 HRP = horseradish peroxidase
 NaCl = sodium chloride
 NADPH = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
 NOX = NADPH oxidase
 PD = Parkinson's disease
 PRDx = peroxiredoxin
 SEM = standard error of the mean
 SH = thiol group
 SOD = superoxide dismutase
 SOH = sulfenic acid
 TGF = transforming growth factor
 TGF β ₁ = transforming growth factor- β ₁
 TGF β ₂ = transforming growth factor- β ₂
 UPDRS = Unified Parkinson's Disease Rating Scale
 WHO = World Health Organization